

Klinik für Neonatologie, Campus Virchow Klinikum

**Effekte von Hyperoxie und Stickstoffmonoxid beim
Neugeborenen**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Kinderheilkunde

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Thomas Höhn

geboren am 3.1.1959 in Göggingen

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. L. Gortner, Giessen

2. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Roth, Köln

eingereicht: 28. Januar 2002

Datum der Habilitation: 1. Oktober 2002

Abkürzungen	4
1. Einleitung	5
1.1. Historisches/Entdeckung von NO	5
1.2. Pathway der NO-Synthese	5
1.3. NO-Synthetasen	7
1.4. Vorkommen in verschiedenen Zelltypen	7
1.5. Funktion	8
1.5.1. Signaltransduktion	8
1.5.2. Vasodilatation	9
1.5.3. Immunabwehr	10
1.6. Krankheitsbilder mit NO-Dysbalancen	11
1.7. Inhalative NO-Applikation	11
1.8. Indikationen für iNO in der Neonatologie	12
1.9. Hyperoxiewirkung auf das Gehirn	13
1.10. Hyperoxiewirkung auf sonstige Organsysteme	13
1.11. L-Selectin	14
1.12. Interaktion von NO und Sauerstoff	14
1.13. Peroxynitrit	15
1.14. Hypothesen	16
2. Methoden	17
2.1. NO-Begasung von Bakterienkulturen	17
2.1.1. Materialgewinnung	17
2.1.2. NO-Exposition	17
2.1.3. Auswertung und Statistik	18
2.2. Hyperoxieexposition im Tiermodell	19
2.2.1. Tierhaltung	19
2.2.2. Hyperoxieexposition	19
2.2.3. Perfusion und Aufarbeitung der Gehirne	19
2.2.4. Lichtmikroskopie	20
2.2.5. Immunhistochemie	21
2.2.6. RT-PCR	22
2.3. <i>In-vitro</i> Gasäquilibrierungsmodell	24
2.3.1. Probengewinnung	24
2.3.2. Gasäquilibrierung von Vollblutproben	24
2.3.3. Flowzytometrie (L-Selectin, Propidiumjodid)	25
2.3.4. Statistik	26

3.	Ergebnisse	27
3.1.	Tracheale Isolate und NO-Begasung	27
3.1.1.	NO-Exposition von <i>S. agalactiae</i> (GBS)	27
3.1.2.	NO-Exposition von <i>S. aureus</i>	27
3.1.3.	NO-Exposition von <i>S. epidermidis</i>	28
3.1.4.	NO-Exposition von <i>E. coli</i>	29
3.1.5	NO-Exposition von <i>P. aeruginosa</i>	29
3.2.	Hyperoxiewirkung auf das Gehirn der unreifen Ratte	30
3.2.1.	Lichtmikroskopische Morphologie	30
3.2.2.	Immunhistochemische Färbungen	31
3.2.2.1.	iNOS	31
3.2.2.2.	Nitrotyrosin	36
3.2.3.	iNOS-Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	37
3.3.	Sauerstoffkonzentration und Aktivierungsverhalten von Granulozyten	39
3.3.1.	Nabelschnurblut	39
3.3.1.1.	Blutgasparameter	39
3.3.1.2.	L-Selectin	39
3.3.1.3.	Propidiumjodid	40
3.3.2.	Erwachsenenblut	41
3.3.2.1.	Blutgasparameter	41
3.3.2.2.	L-Selectin	42
3.3.2.3.	Propidiumjodid	42
4.	Diskussion	43
4.1.	Bakteriostatischer Effekt von NO	43
4.2.	Sauerstoffinduzierte, zerebrale Schädigung durch iNOS-Hochregulation	46
4.3.	Aktivierungsverhalten von Granulozyten	48
5.	Zusammenfassung	51
	Literatur	54
	Danksagung	63
	Lebenslauf	65
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	67

Abkürzungen

CFU	colony forming units
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAB	Diaminobenzidin
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
GBS	B-Streptokokken
HIP	Hippocampus
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 α	Interleukin-1 α
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
MOP	primärer Motorkortex
MOS	sekundärer Motorkortex
MSN	medial septal nucleus
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidhydroxyphosphat
nNOS	neuronale NO-Synthetase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetase
PMN	polymorphonukleäre Leukozyten (Granulozyten)
PPHN	Persistierende pulmonale Hypertension des Neugeborenen
ppm	parts per million
RNOS	reactive nitrogen oxygen species
ROS	reactive oxygen species
RSC	retrosplenial cortex
SGC	lösliche Guanylatcyclase
THA	Thalamus
TNF- α	tumor necrosis factor- α
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1. Historisches/Entdeckung von NO

Die Rolle von Stickstoffmonoxid in der Physiologie und Pathophysiologie von Tier und Mensch war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen während der vergangenen Jahre. Dies gilt nicht nur für seine Funktion als gasförmiges Signalmolekül, sondern auch und gerade wegen seiner vasodilatatorischen Wirkungen. Bis zur Entdeckung der vasoaktiven Wirkung und der Rolle als Neurotransmitter wurde Stickstoffmonoxid als schädigendes Agens betrachtet, das nicht nur die Umwelt, sondern auch das bronchiale und alveoläre Epithel der Lunge in Mitleidenschaft zieht. Im Jahre 1980 konnte Furchgott [Furchgott 1980] zeigen, dass der über Acetylcholin vermittelte Effekt der Vasodilatation in isolierten vaskulären, thorakalen Aortenringen beim Kaninchen abhängig von der endothelialen Funktion ist. Im gleichen Jahr gelang der Nachweis, dass Nitrovasodilatoren durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und dessen Effekt auf die glatte Muskulatur wirken [Murad 1986]. Im Folgenden wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Relaxierung der glatten Muskelzellen durch einen Anstieg des zyklischen GMP verursacht werden könnte [Furchgott 1984]. Furchgott und Ignarro folgerten beide im Jahr 1986, dass endothelium-derived relaxing factor (EDRF) und Stickstoffmonoxid identisch seien [Furchgott 1989, Ignarro 1987]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass in Endothelzellen und in Makrophagen L-Arginin die Vorstufe von NO darstellt, welches danach zu Nitrit und Nitrat metabolisiert wird [Palmer 1987, Hibbs 1987, Palmer 1988].

1.2. Pathway der NO-Synthese

Stickstoffmonoxid wird durch Hydroxylierung von Stickstoff an der Guanidinogruppe von L-Arginin freigesetzt, eine Reaktion, die von NO-Synthetasen (NOS) katalysiert wird.

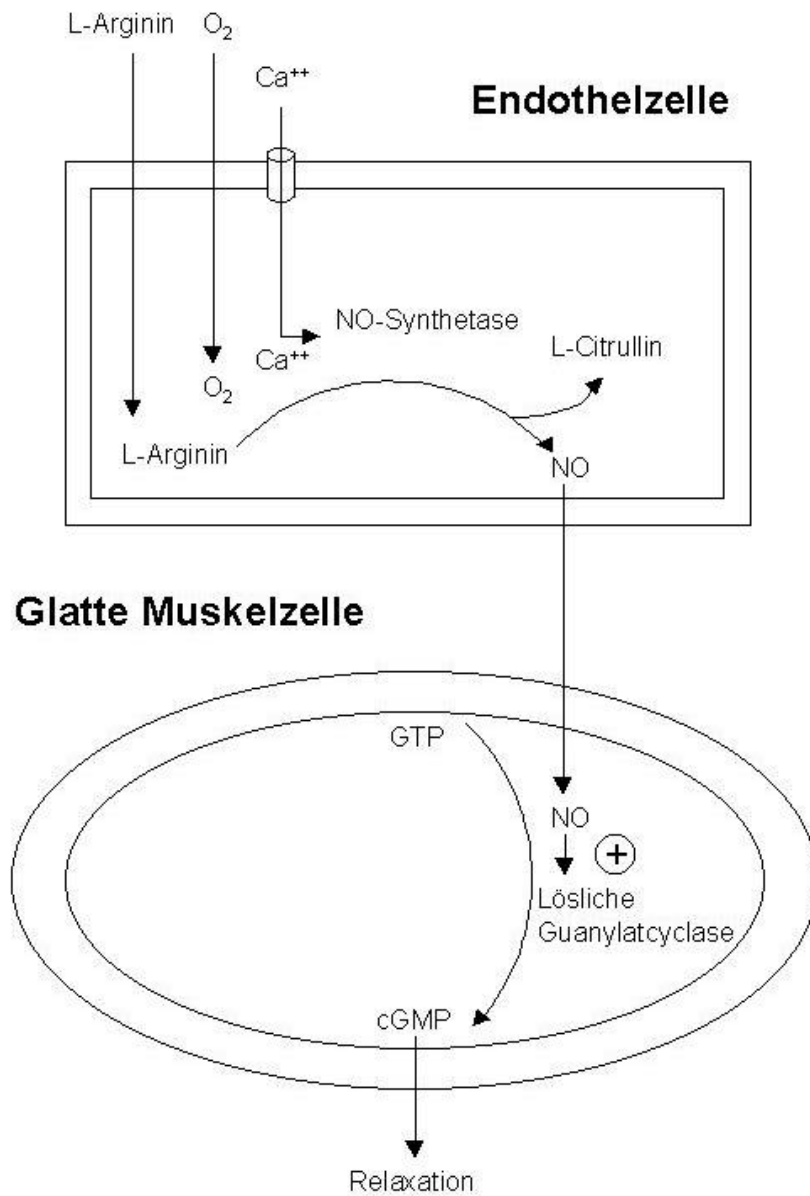


Abbildung 1:

Synthese von NO in der Endothelzelle und Wirkmechanismus in der glatten Muskelzelle
 modifiziert nach: S. Moncada, Biochem Pharmacol 1989)

1.3. NO-Synthetasen

Zur Zeit sind drei Isoformen von NOS bekannt: zwei konstitutive Formen, die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS), und die induzierbare Form (iNOS). Letztere wird durch Bakterien und Zytokine induziert, eine Hochregulierung führt zu deutlich höheren Konzentrationen von produziertem Stickstoffmonoxid als die der konstitutiven Formen [Cunha 1993]. Die resultierenden Stickstoffmonoxid-Konzentrationen besitzen einen antimikrobiellen Effekt gegen verschiedenste bakterielle Pathogene in vivo [Blomqvist 1993]. Eine Übersicht über die wichtigsten Reaktionswege vermittelt Abbildung 2.

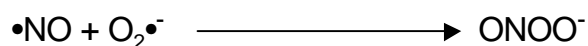
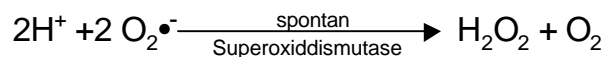
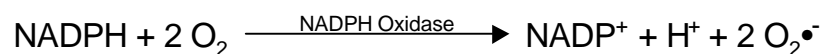
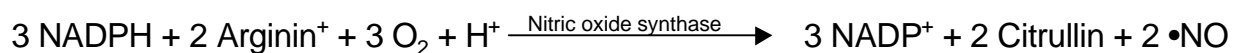


Abbildung 2:

Bildung reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffverbindungen (nach: Forman & Torres, Mol Aspects Med 2001)

1.4. Vorkommen in verschiedenen Zelltypen

Die konstitutiven Formen von NOS sind sowohl in vaskulären Endothelzellen, als auch in Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten nachweisbar. Das Enzym

iNOS ist dagegen in Epithelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen, Hepatozyten und vor allem in Makrophagen vorhanden, und wird bei inflammatorischen Zuständen schnell hochreguliert [Hibbs 1988, Shaul 1994, Asano 1994, Kobzik 1993]. Diese Induktion kann sowohl durch Bakterien erfolgen, als auch durch bakterielle Produkte und durch Zytokine [Weisz 1996]. Die Reaktion des Lungengewebes hängt dabei von der Konzentration des entstehenden Stickstoffmonoxid und dem Vorhandensein verfügbarer Reaktionspartner ab [Liaudet 2000]. Im Gehirn konnte eine Expression von iNOS in Astrozyten, Mikroglia und auch in geringerem Umfang in Endothelzellen nachgewiesen werden [Heneka 2001; Murphy 1993; Brosnan 1997; Minghetti 1998].

1.5. Funktion

Bei zahlreichen Erkrankungen werden der Produktion von Stickstoffmonoxid durch gliale iNOS sowohl protektive als auch schädigende Effekte zugeschrieben [Kröncke 2001]. Zumindest in Lungengewebe konnte gezeigt werden, dass NO sowohl pro- als auch antioxidative Effekte besitzen kann [Weinberger 2001]. Bei niedrigen Konzentrationen von NO überwiegen die antioxidativen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid. Dagegen werden bei hohen Konzentrationen oder anhaltender Produktion von NO (z. B. durch Hochregulation von iNOS oder Anwendung von exogenem Stickstoffmonoxid) zytotoxische, reaktive Stickstoffverbindungen geformt [Wink 1998, Kim 2001]. Auch scheint die Form des Zelluntergangs von der resultierenden NO-Konzentration abzuhängen, niedrige Konzentrationen von Stickstoffmonoxid führen eher zur Apoptose, während hohe Werte die Nekrose zur Folge haben [Bonfoco 1995, Nicotera 1999].

1.5.1. Signaltransduktion

Gemessen an der Reaktionsfreudigkeit anderer Radikale ist die von NO in biologischen Systemen eher gering. Die geringe Molekülgröße und die Lipophilie von NO ermöglichen einen einfachen Transfer über Zellmembranen und prädisponieren so dieses Molekül für die Funktion der Signaltransduktion. In den hierfür erforderlichen Konzentrationen wird Stickstoffmonoxid durch die konstitutiven Formen von NOS (eNOS, nNOS) synthetisiert und in einem engen

Konzentrationsrahmen gehalten [Kröncke 2001]. Der wichtigste zelluläre Rezeptor für NO ist die lösliche Guanylatcyclase (sGC) [Bellamy 2002], eine Reihe physiologischer Effekte werden durch Anheben der intrazellulären Konzentration von cGMP vermittelt. Dabei bindet NO an eine Hämgruppe auf dem Rezeptor und führt zu einer Konformations-änderung, die die Katalyse der cGMP-Synthese um ein Hundertfaches erhöht [Kosarikov 2001].

1.5.2. Vasodilatation

Das in der Endothelzelle produzierte Stickstoffmonoxid diffundiert über die Zellmembran in die benachbarte glatte Muskelzelle, wo die Guanylatzyklase aktiviert wird. Diese Aktivierung führt zu einem intrazellulären Anstieg der cGMP-Konzentration, dies wiederum vermittelt die Relaxierung der vaskulären glatten Muskulatur und bewirkt eine Vasodilatation (siehe Abbildungen 1 und 3).

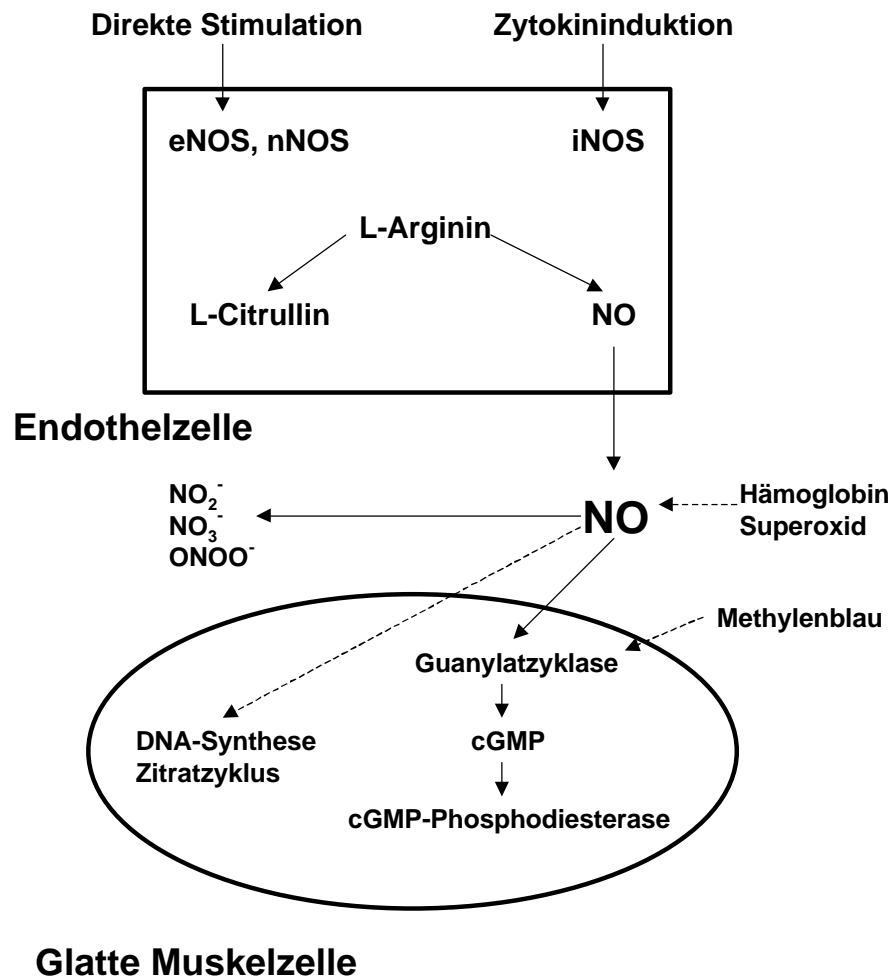


Abbildung 3:
NO-Synthese und Diffusion zur glatten Muskelzelle (Durchgezogener Pfeil: fördernder Effekt; gestrichelter Pfeil: hemmender Effekt; modifiziert nach: Moncada & Higgs, NEMJ 1993)

1.5.3. Immunabwehr

Sobald NO in die Zielzelle (Krebszelle, Parasiten) gelangt, kommt es zu einer Bindung an kupfer- und eisenhaltige Proteine [Änggard 1994]. Als Resultat werden Kupfer und Eisen freigesetzt, welche in Kombination mit Sauerstoff toxische Radikale bilden. Dies bezeichnet man als 'massive oxidative injury' und setzt die

Expression von iNOS voraus, welches zur Produktion von großen Mengen NO führt. Sowohl Endotoxin (Lipopolysaccharide) als auch proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) triggern eine iNOS-Produktion, die letztendlich zu einer erheblichen Bildung von NO führt [Robbins 1994, Nakayama 1992]. Polymorphonukleäre Granulozyten (PMN) besitzen bereits 4h nach Lipopolysaccharid-Stimulation nicht nur einen höheren Nitritgehalt und eine vermehrte Aktivität der NOS, sondern sind auch schneller in der Lage, L-Arginin aufzunehmen [Sethi 2001].

1.6. Krankheitsbilder mit NO-Dysbalancen

Das klassische neonatale Krankheitsbild der vasalen Dysregulation ist die persistierende pulmonale Hypertension des Neugeborenen (PPHN). Dabei kommt es im Verlauf von Tagen zu einer nicht ausreichenden Produktion von NO und einer Zunahme des Vasokonstriktors Endothelin-1 mit dem Effekt einer verminderten Lungendurchblutung und resultierender Hypoxämie. Neugeborene mit PPHN besitzen in den ersten Lebensstunden nicht nur signifikant höhere Endothelin-1-Spiegel als gesunde Kontrollkinder, sondern synthetisieren im Krankheitsverlauf sogar größere Mengen an Stickstoffmonoxid [Endo 2001].

Auch das Krankheitsbild der kongenitalen Zwerchfellhernie ist häufig mit einer PPHN vergesellschaftet. In einem Nitrofen-induzierten Zwerchfellhernienmodell der neonatalen Ratte konnte gezeigt werden, dass die Expression der endothelialen NOS bei betroffenen Tieren deutlich gegenüber den Kontrollen vermindert war [North 1995]. In einem eNOS knock-out Modell der Maus ließ sich durch Hypoxie eine PPHN mit rechtsventrikulärer Hypertrophie reproduzierbar darstellen [Steudel 1998]. Dagegen zeigen adulte eNOS knock-out Mäuse primär systemische Blutdruckregulationsstörungen im Sinne einer arteriellen Hypertonie [Shesely 1996].

1.7. Inhalative NO-Applikation

Wendet man Stickstoffmonoxid in inhalativer Form an (iNO), so bleibt die Vasodilatation auf die Gefäße im Pulmonalkreislauf beschränkt. Dieser Effekt der selektiven pulmonalen Vasodilatation macht iNO in der Behandlung der

pulmonalen Hypertension zu einem vielversprechenden therapeutischen Werkzeug. Bei spontanatmenden Lämmern konnte eine - durch das Thromboxanendoperoxidanalogs U46619 oder Einatmen einer hypoxischen Gasmischung verursachte - pulmonale Hypertension durch inhalatives NO rückgängig gemacht werden [Frostell 1991]. Higenbottam und Mitarbeiter [Pepke-Zaba 1991] beschrieben eine selektive pulmonale Vasodilatation infolge iNO Therapie bei Erwachsenen mit pulmonaler Hypertension. Mittlerweile liegen die Daten von fünf randomisierten, kontrollierten Studien vor, deren Metaanalyse zeigt, dass sich die Oxygenierung von Kindern und Erwachsenen mit akutem hypoxischen Lungenversagen durch inhalatives NO kurzfristig verbessern lässt [Sokol 2000]. Ein Einfluss auf die Mortalität aber ließ sich aber ebenso wenig zeigen wie Auswirkungen auf Effektivitätsparameter der Intensivtherapie (Beatmungsdauer, Krankenhausliegedauer, Verweildauer auf der Intensivstation).

1.8. Indikationen für iNO in der Neonatologie

Bei Neonaten mit PPHN wurde eine Verbesserung der Oxygenierung zuerst von Kinsella [Kinsella 1992] und Roberts [Roberts 1992] im Jahre 1992 berichtet. Seither ist in einer Reihe von randomisierten, kontrollierten Studien der Nachweis der Wirksamkeit bezüglich einer verbesserten Oxygenierung unter iNO-Therapie geführt worden [NINOS 1997, Kinsella 1997, Davidson 1998]. Die Metaanalyse umfasst insgesamt zwölf randomisierte, kontrollierte Studien der Applikation von iNO bei reifen und beinahe reifen Neugeborenen [Finer & Barrington 2001]. Darin zeigen die Autoren, dass iNO den kombinierten Endpunkt Tod oder extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) signifikant reduziert und die Oxygenierung verbessert. Dabei kommt der Effekt durch den verringerten Bedarf von ECMO zustande, die Mortalität bleibt unter iNO-Therapie unverändert. In den folgenden Jahren ließ sich die Wirksamkeit von iNO auch bei der Therapie der PPHN von Frühgeborenen zeigen [Abman 1993, Ahluwalia 1994, Peliowski 1995, Subhedar 1997, Hoehn 1997, 1998]. Allerdings legt hier die Metaanalyse den Schluss nahe, dass mangels ausreichender Daten ein Wirksamkeitsnachweis von iNO für das Kollektiv der Frühgeborenen noch fehlt [Hoehn 2000, Barrington & Finer 2001].

1.9. Hyperoxiewirkung auf das Gehirn

Bezüglich der Wirkung von Hyperoxie auf das unreife Gehirn existieren kaum Daten, verfügbare Untersuchungen deuten jedoch daraufhin, dass hohe Konzentrationen von Sauerstoff zur Schädigung des unreifen Gehirns führen [Ahdab-Barmada 1986]. Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Sauerstoffexposition von 100% für drei Stunden ausreicht, um bei neugeborenen Ratten zu einer ausgedehnten neuronalen Nekrose zu führen. Dieses Schädigungsmuster war mit zunehmender postnataler Reife geringer ausgeprägt und jenseits des 10. Lebenstages praktisch nicht mehr nachweisbar.

1.10. Hyperoxiewirkung auf sonstige Organsysteme

Die Folgen einer Hyperoxieexposition Frühgeborener sind bezüglich ihrer Wirkung auf die unreife Retina [Bland 1980] und auf die unreife Lunge [Chen 1994, O'Donovan 2000, Appleby 2001] gründlich untersucht. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Frühgeborenenretinopathie mit ihrer Obliteration der sich entwickelnden Kapillaren der Retina zumindest teilweise durch die endotheliale NOS und daraus entstehendem Peroxynitrit mediert wird [Brooks 2001]. Die Autoren fanden in einem Mausmodell einen protektiven Effekt einer eNOS-Inhibition (bei knock-out Tieren oder durch pharmakologische Blockade), der die sich entwickelnde Retina vor der Ausbildung einer Retinopathie des Frühgeborenen schützte. Dieser Effekt war unabhängig sowohl von der Expression als auch von der perizytären Verteilung von vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF).

Die bessere Toleranz von Hyperoxie neonataler im Vergleich zu adulten Ratten war Gegenstand einer Untersuchung, die den Influx neutrophiler Granulozyten in die Hyperoxie-exponierte Lunge zum Gegenstand hatte. Dabei lagen die Neutrophilenzahlen der Neonaten selbst nach einer Woche noch unterhalb derer der erwachsenen Tiere nach nur 60h Sauerstoffexposition [Keeney 1995].

1.11. L-Selectin

Leukozyten im peripheren Blut werden während ihrer Lungenpassage variablen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Demzufolge kann es zu einer Aktivierung kommen, die verschiedenste Effekte an entfernten Zielzellen auslösen kann [Stibenz 1994, Taglialatela 1998]. Die Expression des Leukozytenadhäsionsmoleküls L-Selectin (CD62L) wird auf der Zelloberfläche nach inflammatorischer Aktivierung schnell herunterreguliert [Bührer 1994]. Diese Herunterregulierung von L-Selectin wird durch Proteolyse innerhalb von Sekunden erreicht, als Trigger dienen eine Vielfalt von Stimuli wie bakterielle Toxine, aktiviertes Komplement, Zytokine und Wasserstoffperoxid [Kishimoto 1989, Berg 1990, Fraticelli 1996]. Die Herunterregulierung von L-Selectin stellt eines der frühesten, auf der Zelloberfläche stattfindenden Ereignisse der PMN-Aktivierung dar, und fungiert daher als hoch sensibler Marker der Leukozytenaktivierung [Stibenz 1994].

1.12. Interaktion von NO und Sauerstoff

Reaktion von Peroxynitrit mit Kohlendioxid

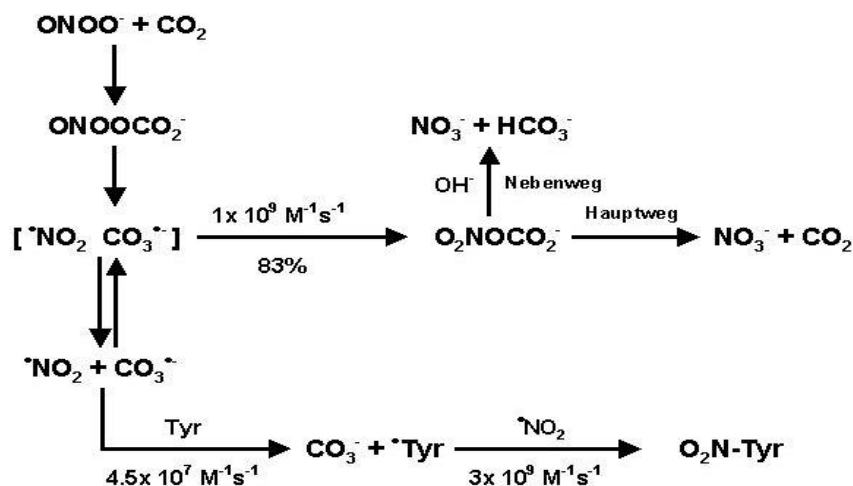


Abbildung 4:

Reaktionswege von Peroxynitrat mit Kohlendioxid (modifiziert nach: Zhang, Nitric Oxide 1997)

Im Gegensatz zu oben Gesagtem ist NO in Anwesenheit von Sauerstoff und reaktiver Sauerstoffmetaboliten (ROS) instabil. Die Interaktion von NO und Sauerstoff führt zur Bildung reaktiver NO-Metaboliten (RNOS), die im Wesentlichen Stickstoffdioxid (NO_2), Distickstofftrioxid (N_2O_3) und Distickstofftetraoxid (N_2O_4) umfassen. Diese Reaktionsprodukte verursachen Schädigung von Geweben durch oxidative Reaktion mit Proteinen, in vielen Fällen induzieren sie auch Kaskaden, die ultimativ den Zelltod zur Folge haben [Kim 2001]. Dabei bestimmt die Konzentration von Stickstoffmonoxid seine biologischen Effekte auf benachbarte Zellen und Gewebe. Die Reaktionsprodukte von Stickstoff und Sauerstoff beinhalten auch das starke Oxidans Peroxynitrit (siehe Abbildung 4), das Ergebnis der Interaktion von NO und Superoxidanion [Kröncke 2001].

1.13. Peroxynitrit

Peroxynitrit, jedoch nicht Stickstoffmonoxid oder Superoxid, nitriert Tyrosinreste von Zellproteinen und formt das stabile Produkt 3-Nitrotyrosin [Demiryürek 2000]. Diese Reaktion geschieht auch spontan, wird aber zusätzlich katalysiert durch Superoxiddismutase oder Kohlendioxid [Cross 1991, Ischiropoulos 1992, Zhang 1997]. Peroxynitrit besitzt nicht nur eine direkt schädigende Wirkung auf Proteine und Zellmembranbestandteile, sondern inhibiert in hohen Dosen auch exogen applizierten Surfactant [Robbins 1995]. Hyperoxie in Verbindung mit gesteigerter Produktion von Stickstoffmonoxid induziert Zelltod und DNA-Fragmentation in Lungengewebe [Raghuram 1999]. Auch dieser Effekt wird auf die Formation von Peroxynitrit zurückgeführt [Koppenol 1992, Lee 2000]. Auch in einem neonatalen, fokalen Ischämiemodell ließ sich zeigen, dass sich im Verlauf von 72h nach Reperfusion sowohl iNOS als auch Nitrotyrosin in neutrophilen Granulozyten und perivaskulären Endothelzellen immunhistochemisch nachweisen ließen [Coeroli 1998]. Ebenfalls in einem Hypoxie-Ischämiemodell gelang im Infarktgebiet nicht nur der vermehrte Nachweis von iNOS und Nitrotyrosin, sondern der iNOS-medierte Schaden ließ sich auch durch Gabe eines selektiven iNOS-Inhibitors reduzieren [Ikeno 2000]. Andere Autoren kamen in einem Inflammationsmodell

beim Schwein zu dem Schluss, dass eine nur minimale Induktion von iNOS bei deutlichem Nachweis von Nitrotyrosin alternative Synthesewege für die Produktion von Nitrotyrosin verantwortlich sein müssen [Javeshghani 2001]. Hingegen zeigte sich in einer *in-vitro*-Untersuchung ein ausreichender Schutz vor einer Nitrierung von Tyrosinresten in Anwesenheit von physiologischen Mengen Glutathion [Kirsch 2001].

1.14. Hypothesen

Postnatal kommt es infolge des Einsetzens der Lungenatmung zu einem drastischen Anstieg der arteriellen Sauerstoffspannung (pO_2 intrauterin: ca. 27-35mmHg, pO_2 postnatal: ca. 70-100mmHg [Mildenberger 1999]). Entsprechend den aktuell gültigen Reanimationsrichtlinien für Neugeborene wird derzeit eine Reanimation grundsätzlich mit 100% Sauerstoff (falls verfügbar) durchgeführt [Kattwinkel 1999, Niermeyer 2000]. Vor diesem klinischen Hintergrund, der spezifischen biologischen Chemie von NO in der Perinatalperiode und offenen Fragen zur Interaktion von NO und Sauerstoff, wurden folgende Hypothesen generiert:

- Stickstoffmonoxid hat im therapeutischen Anwendungsbereich einen selektiv hemmenden Einfluss auf bakterielles Wachstum *in-vitro*
- Hyperoxie induziert eine Hochregulation der iNOS-Expression im unreifen Rattengehirn, deren schädigender Effekt sich anhand der Bildung von Peroxynitrit nachweisen lässt
- Hyperoxie führt zur Aktivierung neonataler polymorphonukleärer Zellen

Zur Beantwortung der Fragestellungen wurden sowohl bakterielle Kulturen auf selektive Hemmung des Wachstums, unreife Ratten in unterschiedlichem postnatalen Alter auf ihr topographisches iNOS- und Peroxynitrit-Expressionsmuster und neonatale versus adulte PMN-Granulozyten auf ihre L-Selectin-Expression untersucht.

2. Methoden

2.1. NO-Begasung von Bakterienkulturen

2.1.1. Materialgewinnung

Die untersuchten Bakterienkulturen stammten aus trachealen Isolaten beatmeter Früh- und Neugeborener, die auf der Intensivstation behandelt wurden. Die fünf Spezies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden in die Untersuchung einbezogen. Alle Proben wurden bis zur Untersuchung bei -20°C in glycerolhaltigem Medium aufbewahrt. Jeweils zehn verschiedenen Stämme jeder Spezies wurden auf Sojaagarplatten ausgestrichen und bei 37°C entweder NO oder Raumluft exponiert. Einzelne Kolonien wurden in eine *brain heart infusion* inokuliert und über Nacht wachsen gelassen. Mittels Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung wurde eine Konzentration von $\sim 1.5 \times 10^8$ colony-forming units (CFU) hergestellt und diese mit dem entsprechenden McFarland Standard verglichen [Hoehn 1998]. Nach einem weiteren Verdünnungsschritt lag die Zahl der CFU bei $\sim 10^2$. Diese Lösung wurde in einer standardisierten Menge von je 100 μl auf jeweils vier Sojaagarplatten ausgewalzt, wovon wiederum jeweils zwei NO- und zwei Raumluft exponiert wurden.

2.1.2. NO-Exposition

Kulturplatten zur NO-Exposition wurden in einem luftdichten Container (gas pack system®) gelagert und über ein Konnektionssystem mit Druckminderer und Flowmeter an ein NO-Vorratssystem angeschlossen. Der Container wurde anschließend in einem Wärmeschrank bei 37°C deponiert und bei unterschiedlichen NO-Konzentrationen (40, 80, 120ppm) für 24 Stunden inkubiert. Die Konzentrationen von NO und NO₂ wurden mittels eines elektrochemischen Detektors kontinuierlich gemessen (Bieler & Lang, Achern, Messgenauigkeit $\sim 2\%$ [Benzing 1993]). Da die NO₂-Bildung von der zur Verfügung stehenden Reaktionszeit von NO und Sauerstoff abhängt, wurde in einem Vorversuch die benötigte Flussgeschwindigkeit der Druckluft ermittelt, die garantiert, dass während der Versuchsdauer keine toxischen NO₂-Konzentrationen erreicht

werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Flow von Raumluft und NO (600ppm in N₂) und die gemessenen Konzentrationen von NO und NO₂

NO-Konzentration	NO₂-Konzentration	Druckluftflow	NO-Flow (600ppm)
40 ppm	1.3 - 1.4 ppm	2.5 l/min	0.21 l/min
80 ppm	2.0 - 2.8 ppm	12.5 l/min	1.6 l/min
120 ppm	5.5 ppm	12.5 l/min	2.5 l/min

2.1.3. Auswertung und Statistik

Nach 24stündiger Begasung wurden die Kulturen aus dem Container genommen und die Anzahl der CFU gezählt. Die Zahl der unter NO-Exposition gewachsenen CFU wurde als prozentualer Anteil der bei Raumluft gewachsenen CFU quantifiziert.

Spearman's Korrelationskoeffizienten und der Wilcoxon Rangsummentest gelangten als statistische Verfahren zur Anwendung, Signifikanz wurde bei einem $p < 0.05$ angenommen. Die Linien der Boxplots stellen Minimum und Maximum dar, die Box enthält 50% der Beobachtungen der empirischen Verteilung.

2.2. Hyperoxieexposition im Tiermodell

2.2.1. Tierhaltung

Terminverpaarte weibliche Wistar-Ratten wurden vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV Berlin) bezogen. Neugeborene Ratten wurden unter Standardbedingungen (24ständiger Rhythmus mit Wechsel von hell/dunkel, freie Verfügbarkeit von Wasser und Futter) mit ihren Müttern gehalten. Die Untersuchungen fanden im Alter von 1, 3 oder 7 Tagen an insgesamt 74 neonatalen Ratten statt. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den aktuellen Tierschutzvorschriften und mit Zustimmung der lokalen Aufsichtsbehörde (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin; G 0232/00) durchgeführt.

2.2.2. Hyperoxieexposition

Sauerstoffexposition fand durch Positionieren des gesamten Käfigs mit der Rattenmutter und den Jungtieren in einem Transportinkubator statt. Die minimale Sauerstoffkonzentration betrug 80% für eine Gesamtdauer von 24h, die Kontrolltiere wurden bei Raumluft gehalten. Unmittelbar nach der Hyperoxieexposition wurden die Jungtiere anästhesiert und perfundiert.

2.2.3. Perfusion und Aufarbeitung der Gehirne

Die Gehirne wurden transkardial zunächst mit heparinisiertem PBS, dann mit Paraformaldehyd (4%) wie vorbeschrieben perfundiert [Ikonomidou 1999]. Zusammenfassend wurde nach Thorakotomie und einer rechtsatrialen Inzision eine Perfusionsnadel von der Herzspitze bis in die ascendierende Aorta vorgeschoben. Nach Applikation von jeweils 20ml (PBS und Paraformaldehyd) erfolgte eine kontinuierliche Perfusion mit eiskaltem Paraformaldehyd (4%) für mindestens 10 Minuten. Anschließend wurden die Gehirne in Paraformaldehyd für insgesamt 3-7 Tage gelagert, danach umdeponiert in angesäuertes PBS (pH 6,6) und eingebettet in Paraffin.

2.2.4. Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Untersuchung wurde mittels eines konventionellen Mikroskops durchgeführt (CH2 bzw. BX60, Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan). Die folgenden Regionen wurden untersucht:

- In den anterioren Abschnitten der primäre motorische Kortex (MOP) und der sekundäre motorische Kortex (MOS) [Abbildung 5]
- In weiter posterior gelegenen Abschnitten der retrospleniale Kortex (RSC), der Hippocampus (HIP) mit den Regionen CA1 und CA3, der Thalamus (THA) und der mediale septale Nucleus (MSN) [Abbildung 6]

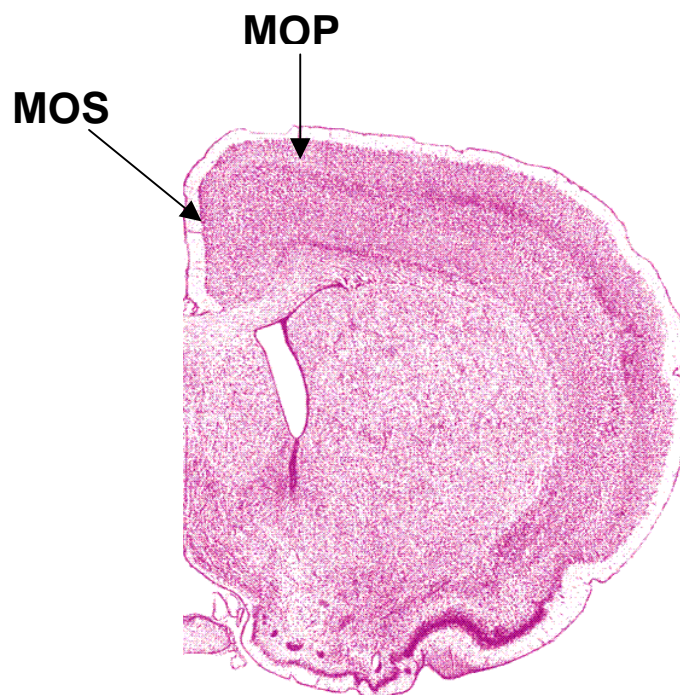


Abbildung 5:

Frontalschnitt des Rattengehirns auf Höhe des motorischen Kortex (primärer motorischer Kortex [MOP], sekundärer motorischer Kortex [MOS]; aus: Brain maps: structure of the rat brain, Swanson LW, Elsevier)

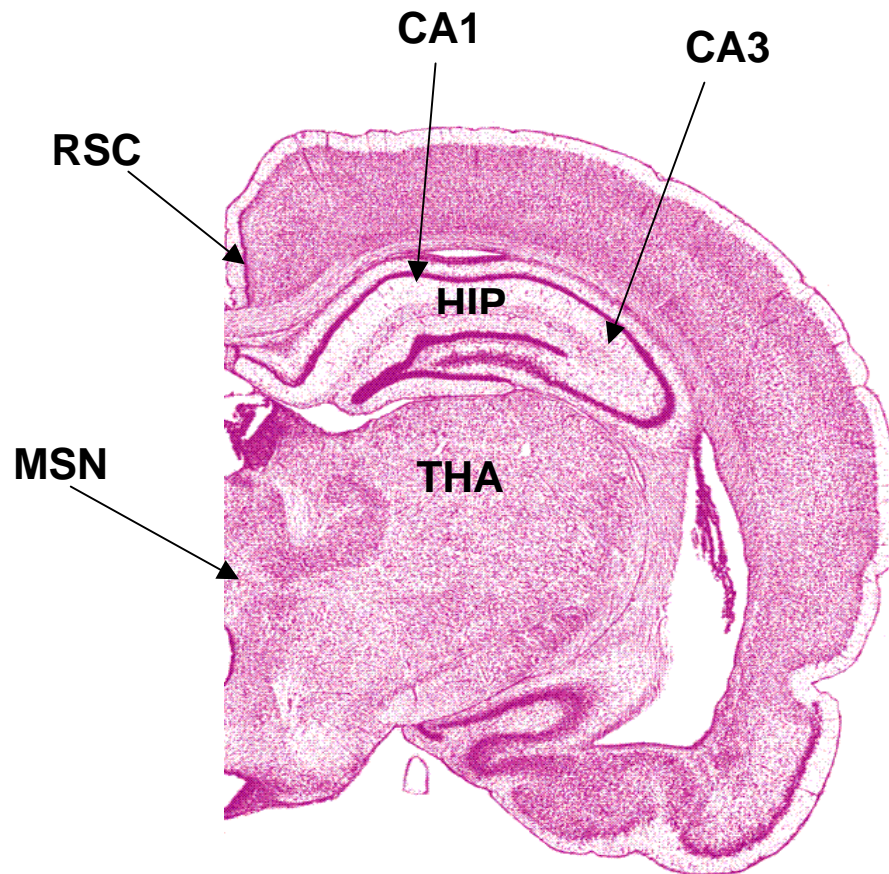


Abbildung 6:

Frontalschnitt des Rattengehirns auf Höhe des Hippocampus (Retrosplenialer Kortex [RSC], CA1 und CA3-Regionen des Hippocampus [HIP], Thalamus [THA], medialer septaler Nucleus [MSN]; aus: Brain maps: structure of the rat brain, Swanson LW, Elsevier)

2.2.5. Immunhistochemie

Die Gehirne wurden wie oben beschrieben perfundiert und in Paraffin eingebettet. Serielle Koronarschnitte wurden mit einer Schichtdicke von 10µm angefertigt (Leica Mikrotom VT 1000S, Leica, Nussloch) und auf silanbeschichtete Objektträger aufgebracht. Der iNOS-Antikörper stammte von der Firma Santa Cruz (Cat.-No. Sc-7271, Santa Cruz, Santa Cruz, USA), der Nitrotyrosin-Antikörper von Upstate Biotechnology (Cat.-No. 06-284, Upstate, Lake Placid, New York, USA). Die verwendete Konzentration der Antikörper betrug 1:100 (iNOS) bzw. 1:500 (Nitrotyrosin). Nach Deparaffinisierung durch Waschen in Xylen und einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte in einem Zitratpuffer

(0,01M, pH 6,6) erhitzt um Antigenstellen zu demaskieren. Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser gekühlt und in PBS gewaschen. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 0,6% Wasserstoffperoxid in PBS für 30 Minuten geblockt. Nach erneutem Waschen in PBS wurde für 20 Minuten mit 5% Ziegenerum in PBS inkubiert um unspezifische Bindungen zu verhindern. Dann wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht inkubiert. Nach Entfernen des Primärantikörpers und repetitivem Spülen mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG antibody, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Die immunohistochemische Detektion positiver Zellen wurde mit Hilfe eines Avidin-biotinylierten Peroxidasekomplexes (ABC-kit von Vecstatin, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und DAB-Substrat durchgeführt (ebenfalls von Vector Laboratories, Burlingame, USA). Nach mehrfachem Waschen in PBS und TRIS Puffer wurde eine Gegenfärbung mit Methylgrün (10%) für 5 Minuten angeschlossen. Zur endgültigen Fixierung wurden Butanol und Xylen verwendet. Die Schnitte wurden lichtmikroskopisch ausgewertet (CH2, Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan), die Fotodokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (C-3030, Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan).

2.2.6. RT-PCR

Für diese Untersuchungen wurden die Gehirne nach der Paraformaldehydperfusion *in toto* entnommen und in einzelne Gehirnnareale zerteilt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -70°C eingefroren. Die RNA wurde mittels eines RNeasy®-Kits (Quiagen, Bothell, USA) isoliert, dabei wurde eine Konzentration von 0,1µg/µl in allen Proben angestrebt. Pro Tier wurden etwa 80mg Gehirngewebe für 30 Sekunden homogenisiert und mit 1ml RLT-Puffer und 10µl β-Mercaptoethanol versetzt. Die Lysate wurden anschließend mit 5000rpm bei 4°C für 3 Minuten zentrifugiert, für die Messung wurden 500µl des Überstands mit der gleichen Menge Äthanol 70% verdünnt. Dann wurden 500µl der Lysat-Äthanol-Mischung auf die Säule aufgetragen (RNeasy® mini) und mit 10000rpm bei 4°C für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Filtrats wurde die Prozedur mit dem Rest der Lysat-Äthanol-Mischung wiederholt. RW1 Puffer (700µl) wurde dann zur Säule hinzugefügt, anschließend mit 10000rpm für

15 Sekunden zentrifugiert. Dann wurde ein 2ml-Gefäß mit der RNeasy® mini-Säule verbunden, mit 500µl RPE Puffer gefüllt und mit 10000rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrats wurde die Prozedur mit der gleichen Menge RPE Puffer wiederholt, diesmal erfolgte die Zentrifugierung für 4 Minuten mit 13000rpm. Zur Eluation der RNA von der Säule wurde ein 1,5ml-Behälter benutzt. 50µl RNase-freies Wasser wurde auf die Membran pipettiert und anschließend bei 13000rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt. Das Volumen der extrahierten RNA lag bei ca. 100µl. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch gemessen (E260/E280) und auf Werte von 0,1µg/µl eingestellt.

Die reverse Transkription von 1µg RNA in cDNA wurde unter Verwendung von Random Hexameren und AMV reverser Transkriptase (Promega, Mannheim) und 1× PCR Puffer durchgeführt (20mM Tris · HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 2mM MgCl₂, und 100µg/ml bovinem Albumin). Die cDNA wurde mittels PCR in einem Gesamtvolumen von 30µl mit 5U/µl Taq DNA Polymerase (Gibco, Eggenstein) amplifiziert, weiter enthalten waren 4µl 1mM dNTP, 0,75µl MgCl₂ (20mM), 5µl 10xPCR-Puffer, 15,6µl Aqua und 1µl von jedem Primer. Die Amplifikation erfolgte in einem mikroprozessorgesteuerten Thermocycler (Multicycler PTC-200 MJ Research, Biozym, Hessisch Oldendorf).

Die für die β-Actin-Bestimmung verwendeten Primer hatten die folgende Sequenz (PCR-Produkt: 897 bp): 5'-CCC TAA ggC CAA CCg TgA AAA gAT g-3' (sense; 1663-1687nt) und gAA CCg CTC ATT gCC gAT AgT gAT g-3' (antisense; 2535-2559nt). Für die Amplifikation des β-Actin wurden 30 Zyklen durchgeführt (30" bei 94°C, 60" bei 60°C und 60" bei 72°C). Die Sequenzen der iNOS-Primer lauteten (PCR-Produkt: 388 bp; MWG-Biotech, Ebersberg): 5'-AgC ATC ACC CCT gTg TTC CAC CC-3' (sense; 1592-1613nt) und 5'-Tgg ggC AgT CTC CAT TgC CA-3' (antisense; 1979-1960nt). Für die iNOS-PCR wurden 30 Zyklen durchgeführt (30" bei 94°C, 60" bei 60°C und 60" bei 72°C). Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel (2%) elektrophoretisch aufgetrennt, die Darstellung erfolgte durch Zugabe von Ethidiumbromid und UV-Exposition zur Fotodokumentation.

2.3. *In-vitro* Gasäquilibrierungsmodell

2.3.1. Probengewinnung

Nabelschnurblut wurde unmittelbar postnatal bei gesunden, reifen Neugeborenen entnommen, die entweder per Sectio oder vaginal spontan geboren wurden. Adultes venöses Blut stammte von gesunden Freiwilligen, in beiden Fällen lag ein entsprechendes Einverständnis vor. Keines der Neugeborenen zeigte klinische Zeichen einer Infektion oder wurde auf eine neonatologische Station aufgenommen. Nabelschnurblut und Erwachsenenblut wurden beide unter Zuhilfenahme eines Vakutainersystems abgenommen, dessen Zweck es war, eine Äquilibration mit Raumluft zu verhindern. Die Antikoagulation erfolgte mit Natriumcitrat, der pH wurde durch Hinzufügen von HEPES (N-[2-Hydroxyäthyl] Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure) konstant gehalten. Hämoglobinmessungen wurden mit einem Blutgasgerät ABL/OSM-3 durchgeführt (Radiometer Copenhagen, Dänemark).

2.3.2. Gasäquilibration von Vollblutproben

Nach Probengewinnung fand eine Gasäquilibration mit entweder 0%, 21% oder 100% Sauerstoff für 30 Minuten wie vorbeschrieben statt [Ehme 1998]. Der Flow des jeweiligen Gases wurde auf eine Luftblase pro Sekunde limitiert (Abbildung 7). Unmittelbar nach der Äquilibration wurden die Behälter luftdicht verschlossen und bei Raumtemperatur inkubiert. Blutgasanalysen wurden vor und nach der Äquilibration sowie nach 24 Stunden durchgeführt.



Abbildung 7:

Äquilibrierungsgerät für die Konditionen Hypoxie, Normoxie und Hyperoxie (Fa. Witt, Gasetechnik GmbH, Witten)

2.3.3. Flowzytometrie (L-Selectin, Propidiumjodid)

Die Expression von L-Selectin wurde durch Reaktion mit dem monoklonalen antihumanen L-Selectin-Antikörper Leu-8 wie vorbeschrieben quantifiziert [Bührer 1994]. Die Viabilität der Zellen wurde mit der Aufnahme von Propidiumjodid getestet (4mg/mL, 15min, 4°C), das durch die Plasmamembran intakter Zellen ausgeschlossen wird. Die Durchflusszytometrie wurde mit einem FacScan® Zytometer durchgeführt (Becton Dickinson, Heidelberg), das mit einem 488 nm Argon Laser ausgestattet ist. Zur Datenanalyse wurde die Cellquest® Software (Becton Dickinson) verwendet. Die L-Selectin-Expression wurde in willkürlichen Einheiten ausgedrückt, die den Unterschied zwischen der Medianfluoreszenz der FITC-Leu-8-gefärbten und den FITC-IgG2-markierten Kontrollproben darstellen. Die Veränderung der Medianfluoreszenz wurde ebenfalls für die Propidiumjodidfärbung nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz errechnet (repräsentative Histogramme sind in Abbildung 8 dargestellt).

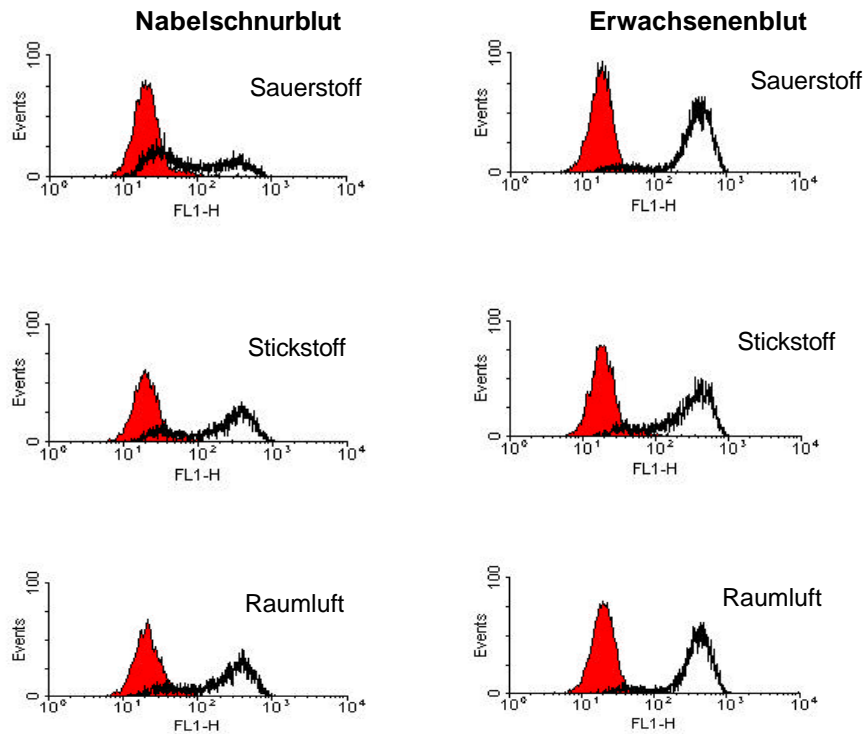


Abbildung 8:

Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Zellzahl von PMN-Zellen aus Nabelschnurblut und Erwachsenenblut nach 100%, 21% oder 0% Sauerstoffexposition und Inkubation für 6h (monoclonaler anti-humaner L-Selectinantikörper Leu-8; graue Fläche repräsentiert Kontrollen, schwarze Kurve zeigt die Fluoreszenzintensität des FITC-markierten Leu-8 als Marker der L-Selectin-Expression und deren Variation infolge Exposition gegenüber verschiedenen O₂-Konzentrationen).

2.3.4. Statistik

Die Daten sind als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Der Wilcoxon Test wurde verwendet, um den zeitlichen Effekt innerhalb einer definierten Sauerstoffkonzentration zu errechnen, indem die initialen Fluoreszenzwerte mit denen am Ende der Untersuchung verglichen wurden. Mit dem Friedman-Test wurde nach signifikanten Unterschieden zwischen Proben verschiedener Gaskonzentrationen desselben Donors über den Untersuchungsverlauf gesucht. Fluoreszenzwerte im Vergleich Nabelschnur- und Erwachsenenblut wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests zu verschiedenen Zeitpunkten und Gaskonzentrationen untersucht. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Tracheale Isolate und NO-Begasung

3.1.1. NO-Exposition von *S. agalactiae* (GBS)

Mit zunehmender NO-Konzentration zeigte sich ein reduziertes Wachstum von B-Streptokokken. Statistische Signifikanz erreichte dieser Effekt erst bei einer Konzentration von 120ppm, dies auch nur in der Gruppe der 10µl-Inokulum-Platten (Abbildung 9).

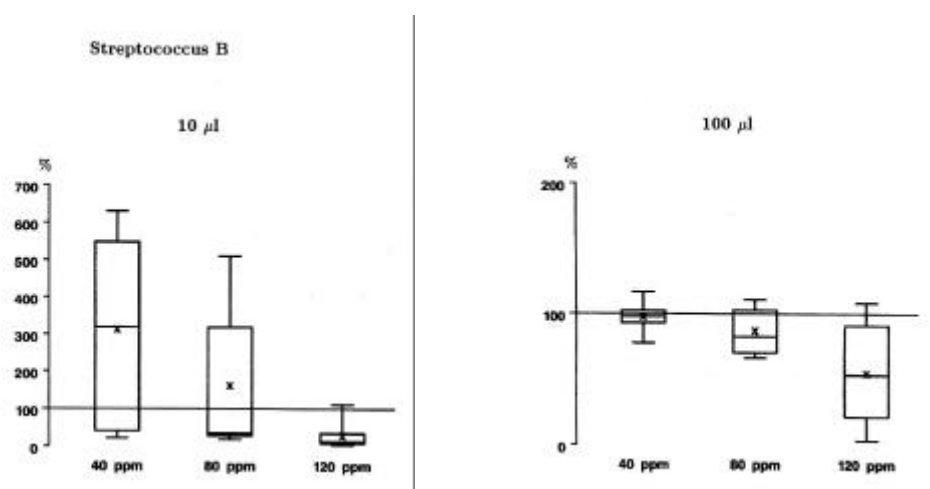


Abbildung 9:

Wachstum von *S. agalactiae* (GBS) bei 40, 80 und 120ppm NO im Vergleich verschiedener Inokula (10µl und 100µl; n=20)

3.1.2. NO-Exposition von *S. aureus*

Paradoxerweise fand sich in den 10µl-Inokulum-Kulturen ein vermehrtes Wachstum bei höheren NO-Konzentrationen ($p < 0.05$). Dieser Effekt liess sich bei den Kulturen mit dem größeren Inokulum nicht bestätigen, das Wachstum von *S. aureus* war durch Zugabe von NO weder beeinträchtigt noch vermehrt (Abbildung 10).

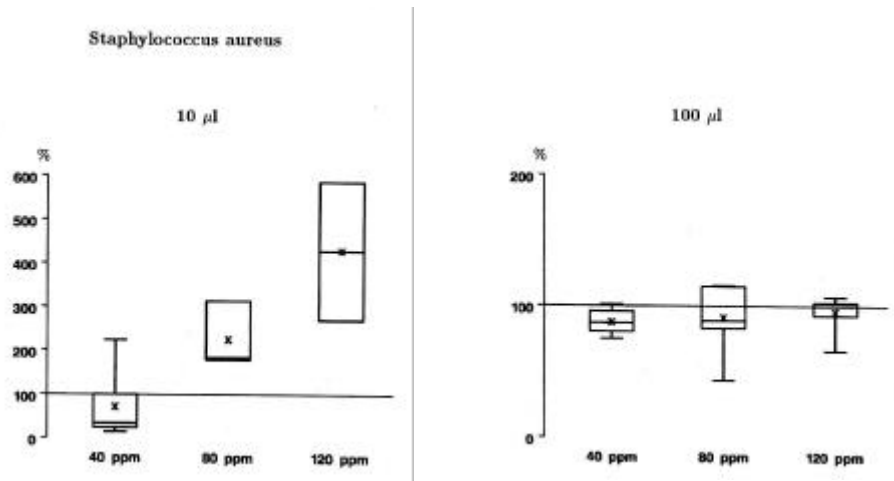


Abbildung 10:

Wachstum von *S. aureus* bei 40, 80 und 120ppm NO im Vergleich verschiedener Inokula (10µl und 100µl; n=20)

3.1.3. NO-Exposition von *S. epidermidis*

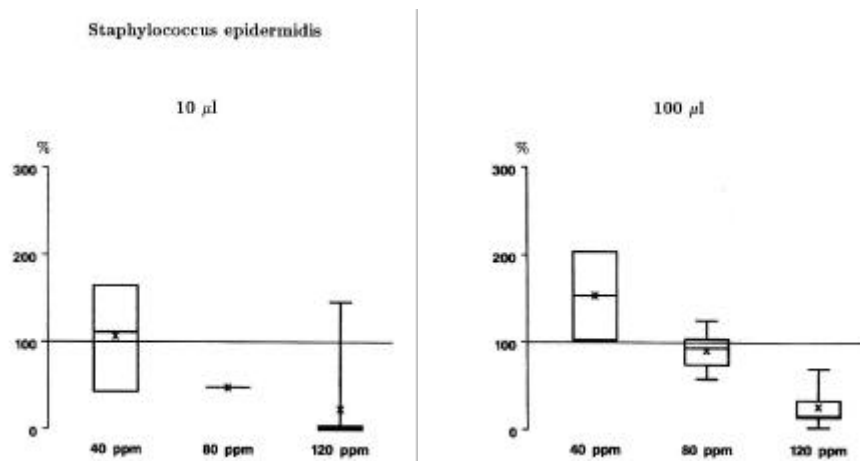


Abbildung 11:

Wachstum von *S. epidermidis* bei 40, 80 und 120ppm NO im Vergleich verschiedener Inokula (10µl und 100µl; n=20)

Sowohl bei 40ppm als auch bei 80ppm bestand kein Unterschied zwischen NO-exponierten Kulturen und Kontrollen. Bei beiden Inokula (10µl und 100µl) war das

bakterielle Wachstum bei 120ppm signifikant verringert ($p < 0.01$; Abbildung 11).

3.1.4. NO-Exposition von *E. coli*

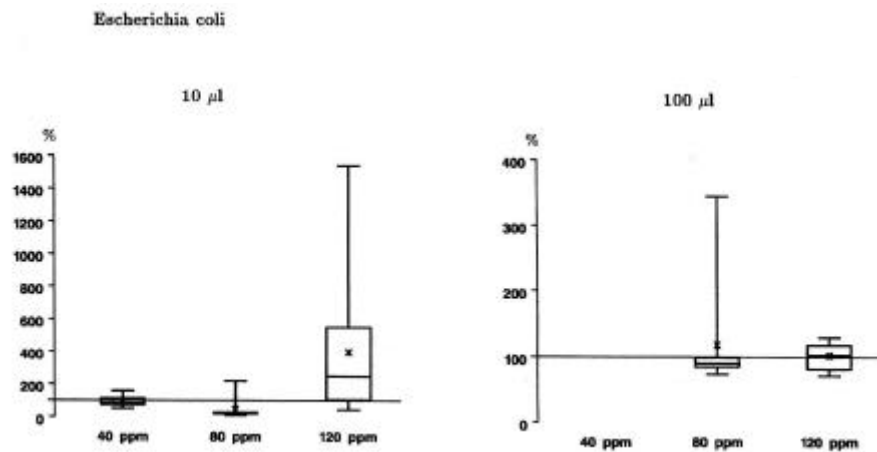


Abbildung 12:

Wachstum von *E. coli* bei 40, 80 und 120ppm NO im Vergleich verschiedener Inokula (10µl und 100µl; n=20)

Das bakterielle Wachstum war bei 40ppm und 80ppm zwischen NO-exponierten- und Kontrollkulturen vergleichbar. Lediglich bei 120ppm war ein statistisch nicht signifikant vermehrtes Wachstum der NO-Kulturen nachweisbar (Abbildung 12).

3.1.5. NO-Exposition von *P. aeruginosa*

In beiden Inokulumgruppen war das Wachstum von *P. aeruginosa* bei allen drei NO-Konzentrationen gleich ausgeprägt (Abbildung 13).

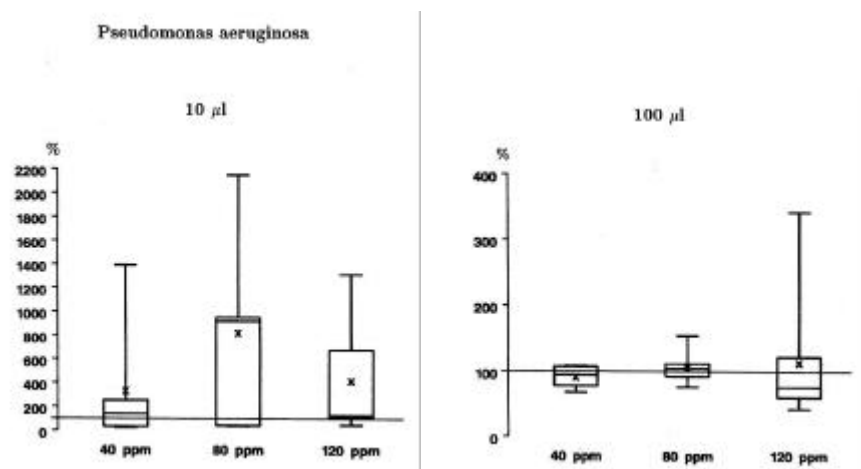


Abbildung 13:

Wachstum von *P. aeruginosa* bei 40, 80 und 120ppm NO im Vergleich verschiedener Inokula (10µl und 100µl; n=20)

3.2. Hyperoxiewirkung auf das Gehirn der unreifen Ratte

3.2.1. Lichtmikroskopische Morphologie

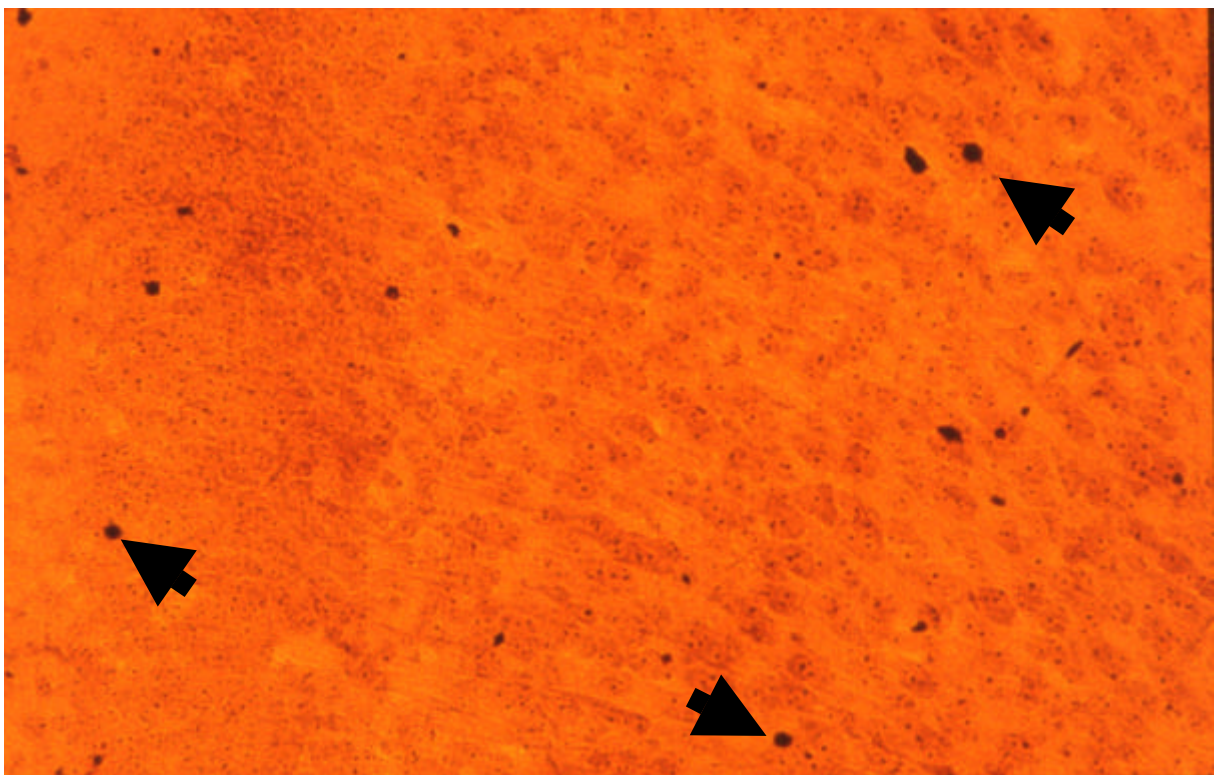
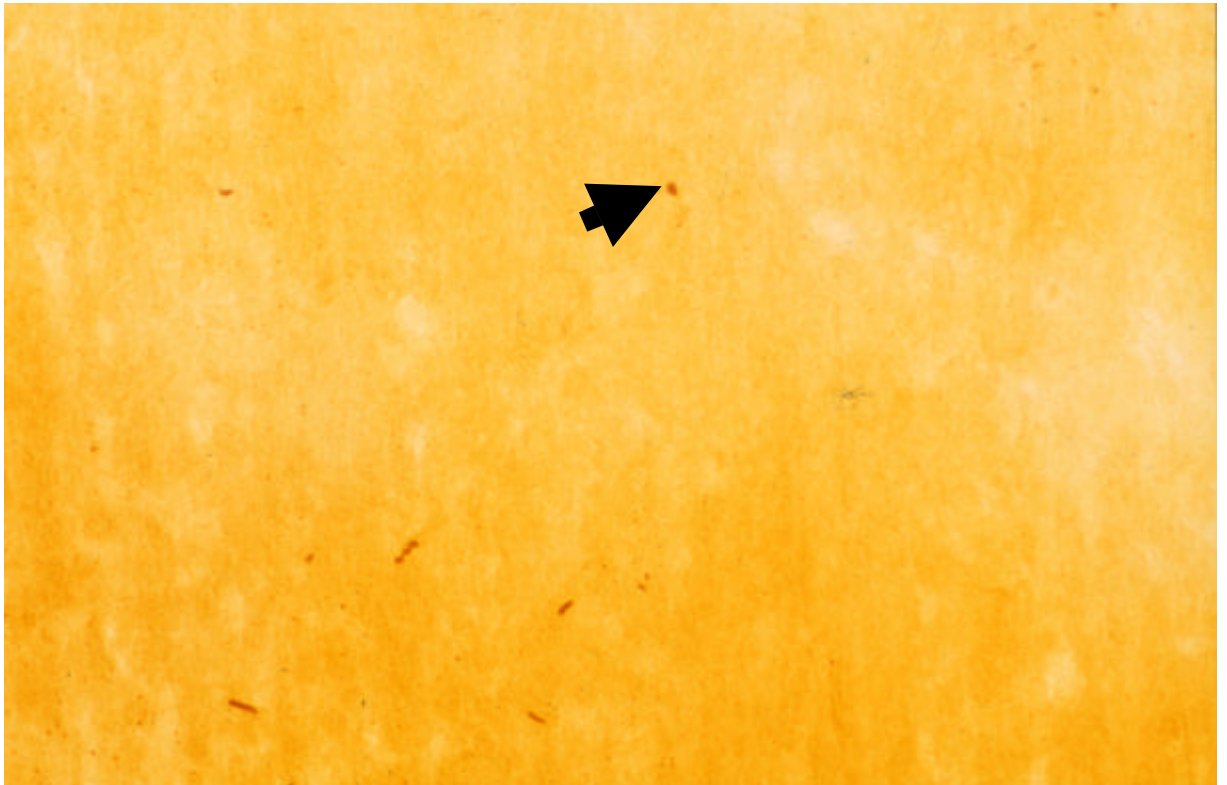


Abbildung 14:

Silberfärbung nach de Olmos im primären motorischen Kortex (MOP) bei einem 7 Tage alten Kontrolltier mit wenigen braun gefärbten, apoptotischen Neuronen (oben, Vergrößerung 200x) und im sekundären motorischen Kortex (MOS) nach 24stündiger Sauerstoffexposition (unten, Vergrößerung 200x) mit deutlich vermehrter Anzahl apoptotischer Neurone

Apoptotische Veränderungen fanden sich in deutlich vermehrter Anzahl in den Gehirnen sauerstoffexponierter Tiere (siehe Abbildung 14). Dieses Ergebnis entsprach den lichtmikroskopischen Befunden aus der HE-Färbung und war Anlaß nach Mechanismen der proapoptotischen Funktion von Hyperoxie einerseits und der Beteiligung einer vermehrten NO-Synthese andererseits zu suchen.

3.2.2. Immunhistochemische Färbungen

3.2.2.1. *iNOS*

Kontrolltiere zeigten deutlich geringer ausgeprägte oder keine immunhistochemische Färbung mit iNOS-Antikörper im Vergleich zu den Hyperoxie-exponierten Tieren. Sowohl bei 1, 3 als auch bei 7 Tage alten Tiere konnten ubiquitär iNOS-positive Zellen infolge von Sauerstoffexposition nachgewiesen werden. Die ausgeprägtesten Veränderungen fanden sich bei den 7 Tage alten Tieren, bei 1 und 3 Tage alten Ratten war die Farbtintensität für iNOS vergleichbar ausgeprägt und insgesamt geringer vorhanden. Bei iNOS-positiven Zellen handelte es sich morphologisch überwiegend um Mikrogliazellen, aber auch Endothelzellen im Bereich der Gefäße zeigten eine Reaktion. Am deutlichsten betroffen waren die Areale Hippocampus (CA1-Region, Abbildung 16), der primäre motorische Kortex (MOP, Abbildung 15), der sekundäre motorische Kortex (MOS, Abbildung 17) und der retrospleniale Kortex (RSC, Abbildung 18). Weniger stark betroffen, aber auch mit mikroglialer Expression iNOS-positiver Zellen versehen waren der Thalamus (THA, Abbildung 19) und der mediale septale Nucleus (MSN, Abbildung 20).

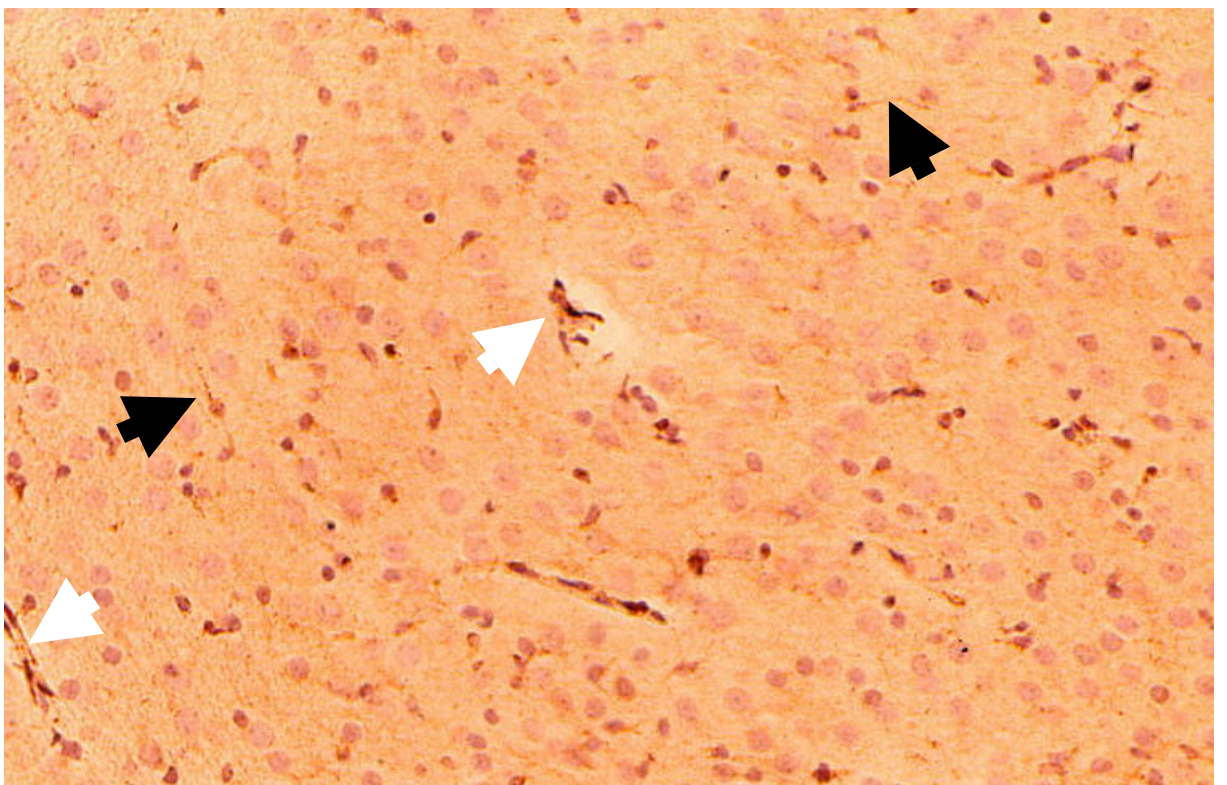
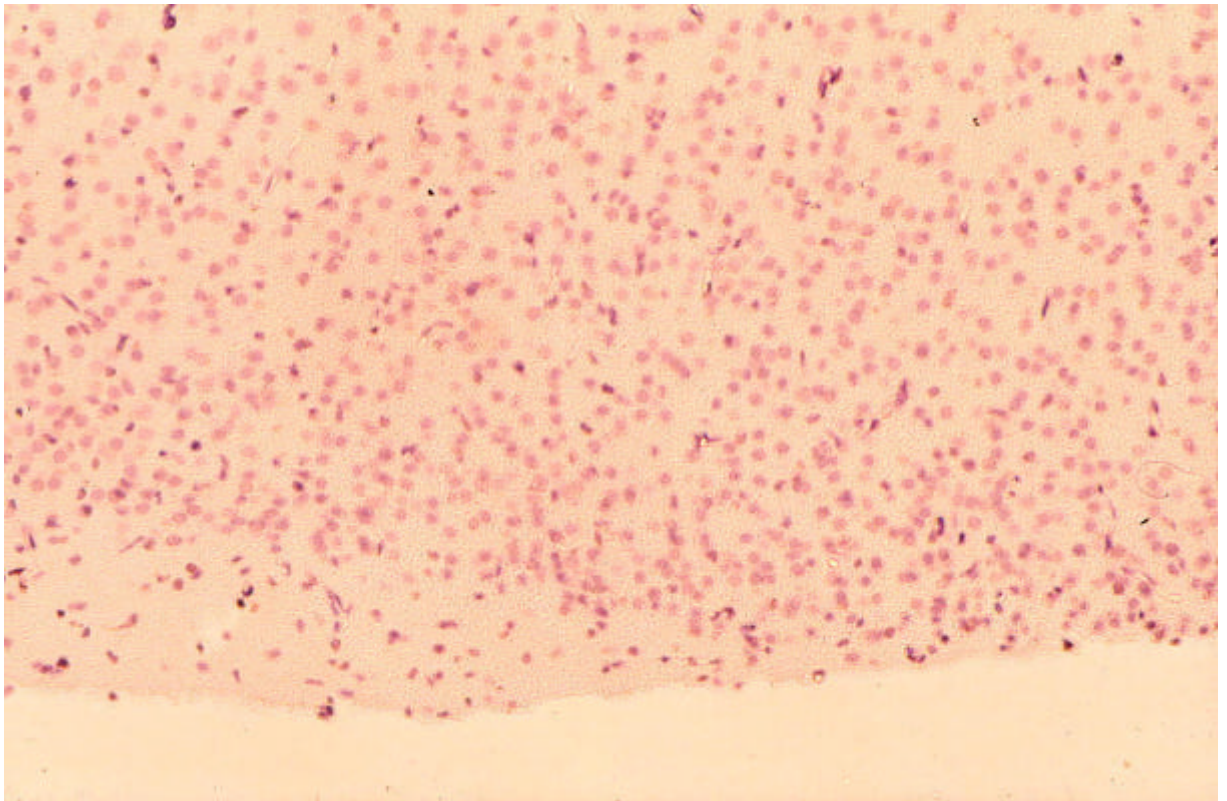


Abbildung 15:

Immunhistochemische Färbung mit iNOS-Antikörper im primären motorischen Kortex (MOP) von 7 Tage alten Ratten im Vergleich von Kontrollen (oben, Vergrößerung 200x) und Hyperoxie-exponierten Tieren (unten, Vergrößerung 400x). Weiße Pfeile zeigen perivaskulär gelegenen Endothelzellen, schwarze Pfeile Mikrogliazellen

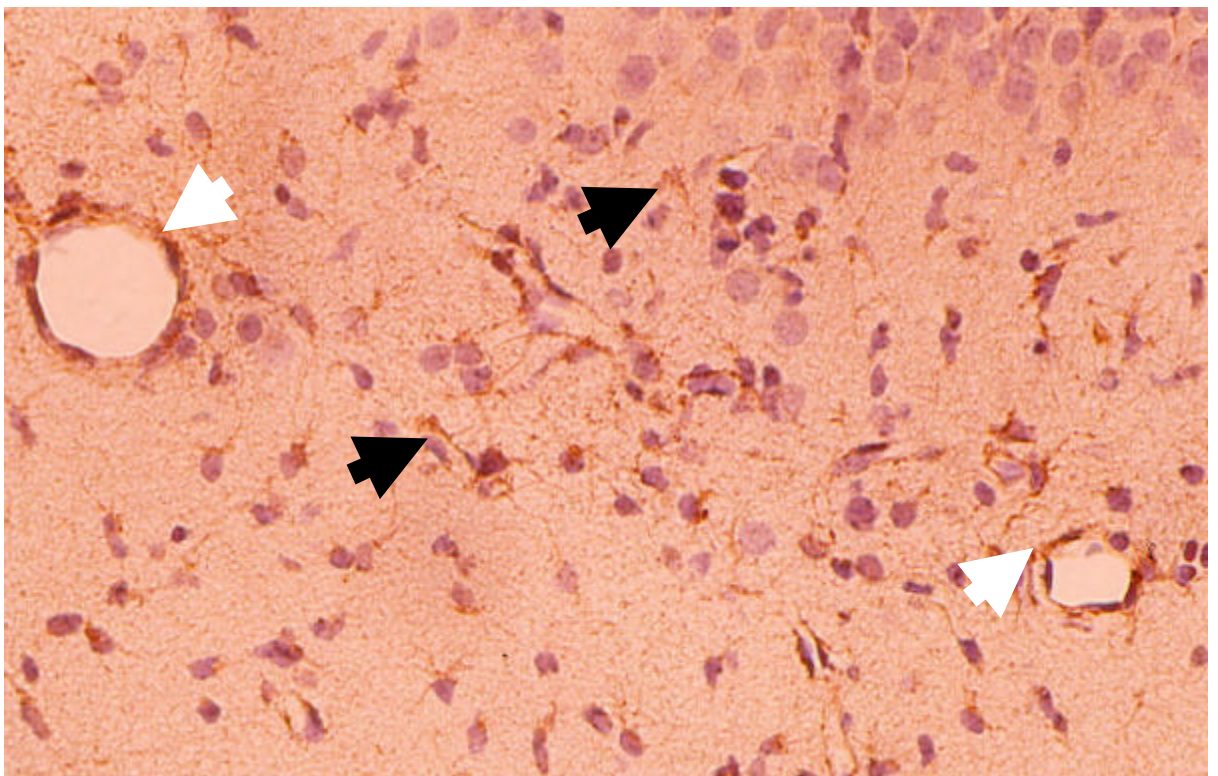
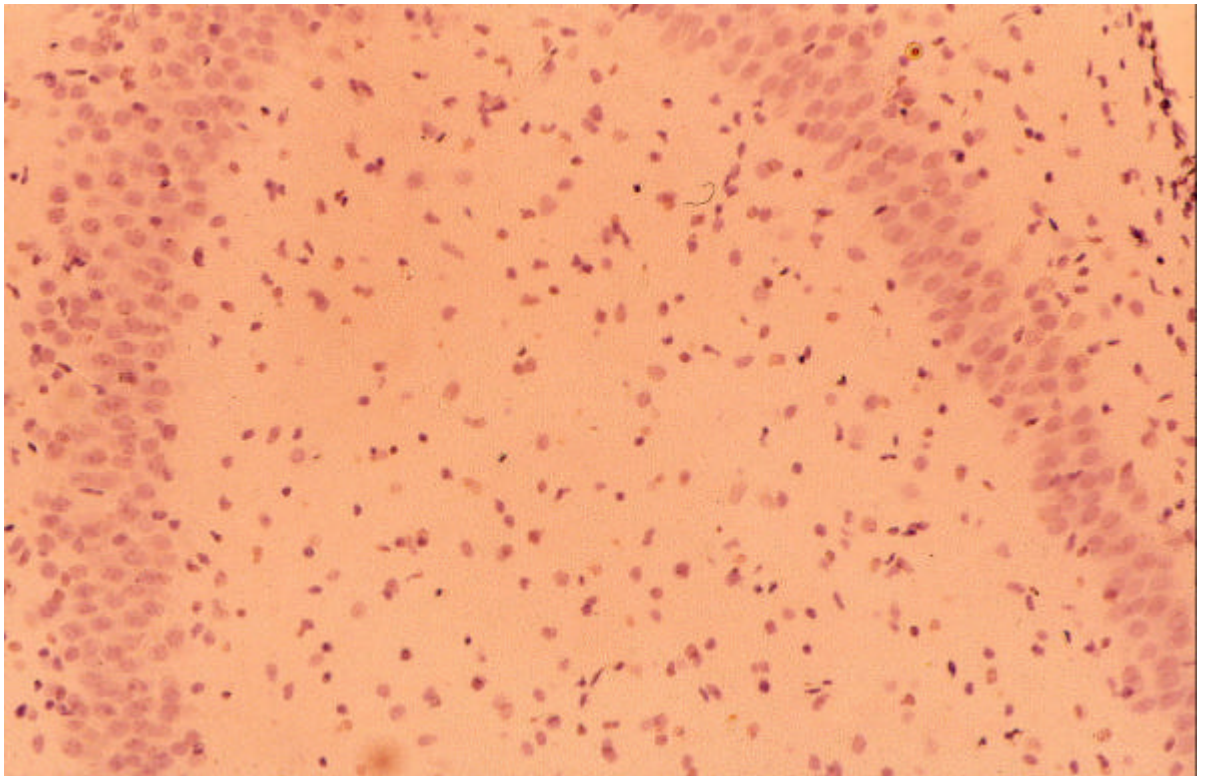


Abbildung 16:

Immunhistochemische Färbung mit iNOS-Antikörper im Hippocampus (CA1-Region) von 7 Tage alten Ratten im Vergleich von Kontrollen (oben, Vergrößerung 400x) und Hyperoxie-exponierten Tieren (unten, Vergrößerung 400x). Neben den perivaskulär gelegenen Endothelzellen (weiße Pfeile) färben sich vor allem Mikrogliazellen (schwarze Pfeile) an

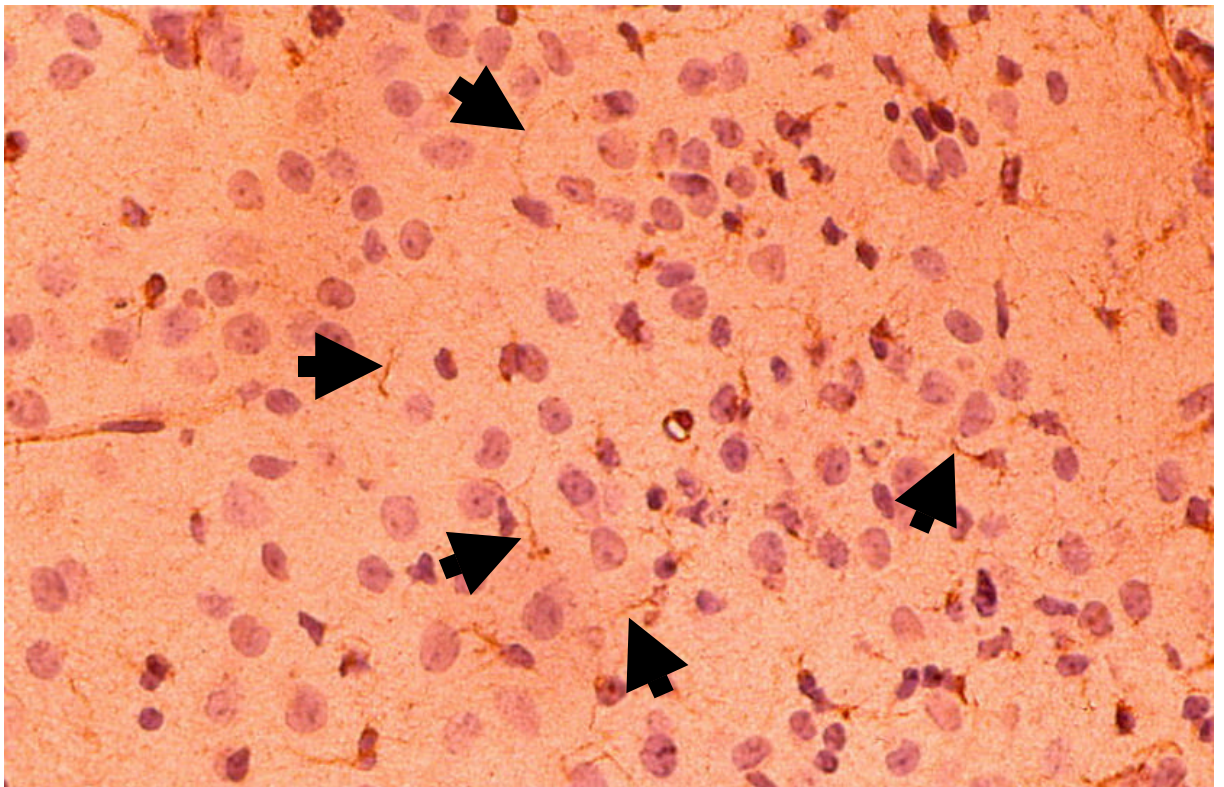


Abbildung 17:

Immunhistochemische Färbung mit iNOS-Antikörper im sekundären motorischen Kortex (MOS) von 3 Tage alten Ratten (Pfeile zeigen spezifische Färbung von Mikroglia; Vergrößerung 400x)

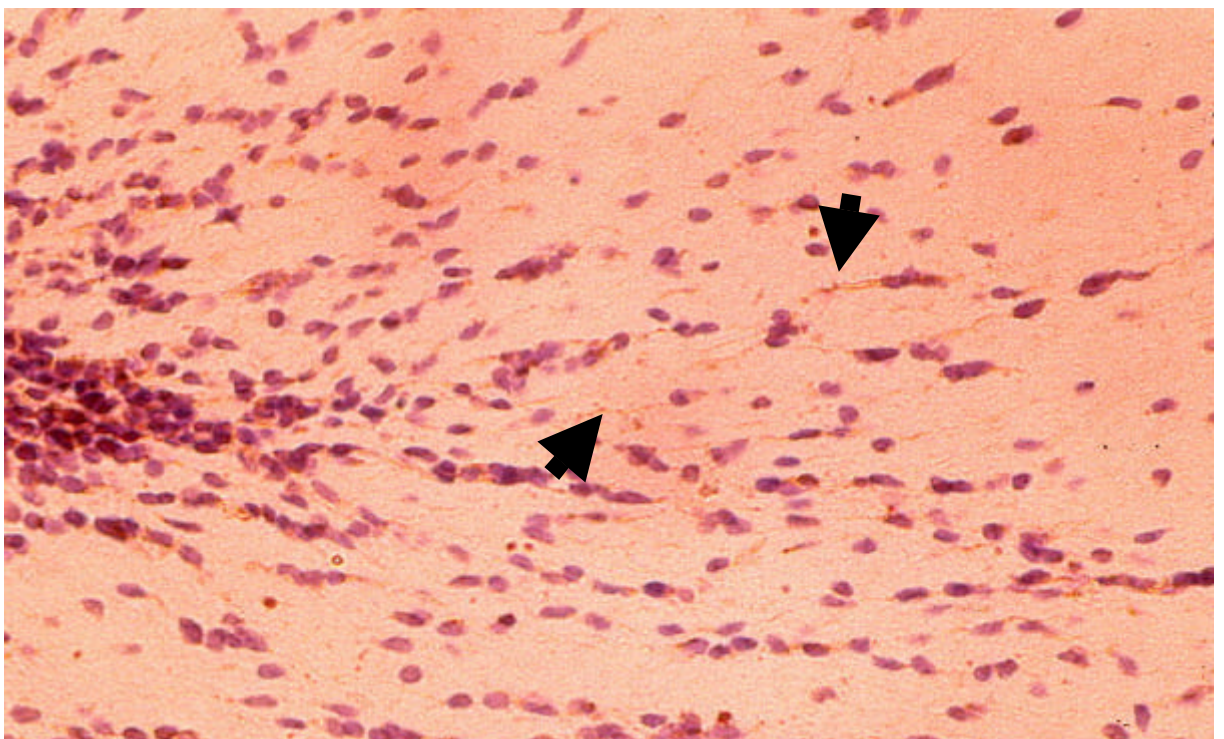


Abbildung 18:

Immunhistochemische Färbung mit iNOS-Antikörper im retrosplenialen Kortex (RSC) von 3 Tage alten Ratten (die Pfeile zeigen auf iNOS-positive Mikroglia; Vergrößerung 400x)

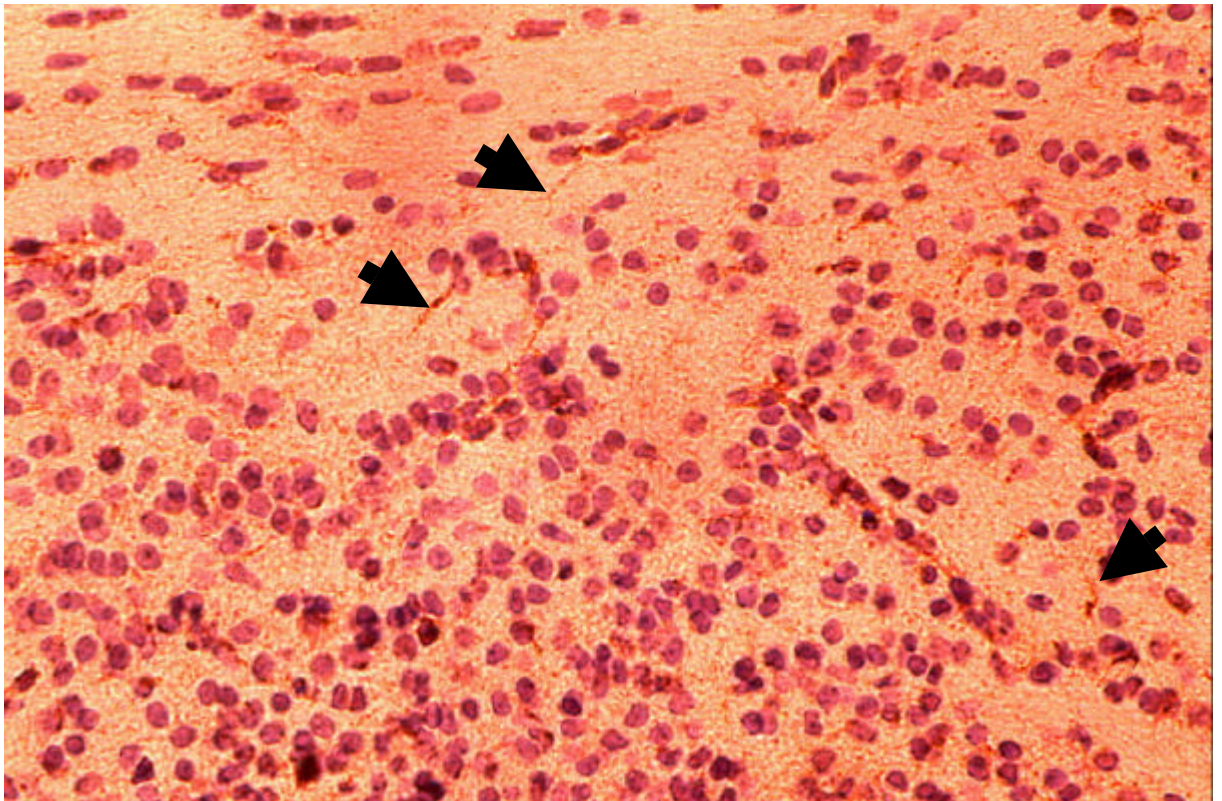


Abbildung 19:

Immunhistochemische Färbung mit iNOS-Antikörper im Thalamus (THA) von 3 Tage alten Ratten (Pfeile zeigen spezifische Färbung von Mikrogliä; Vergrößerung 400x)

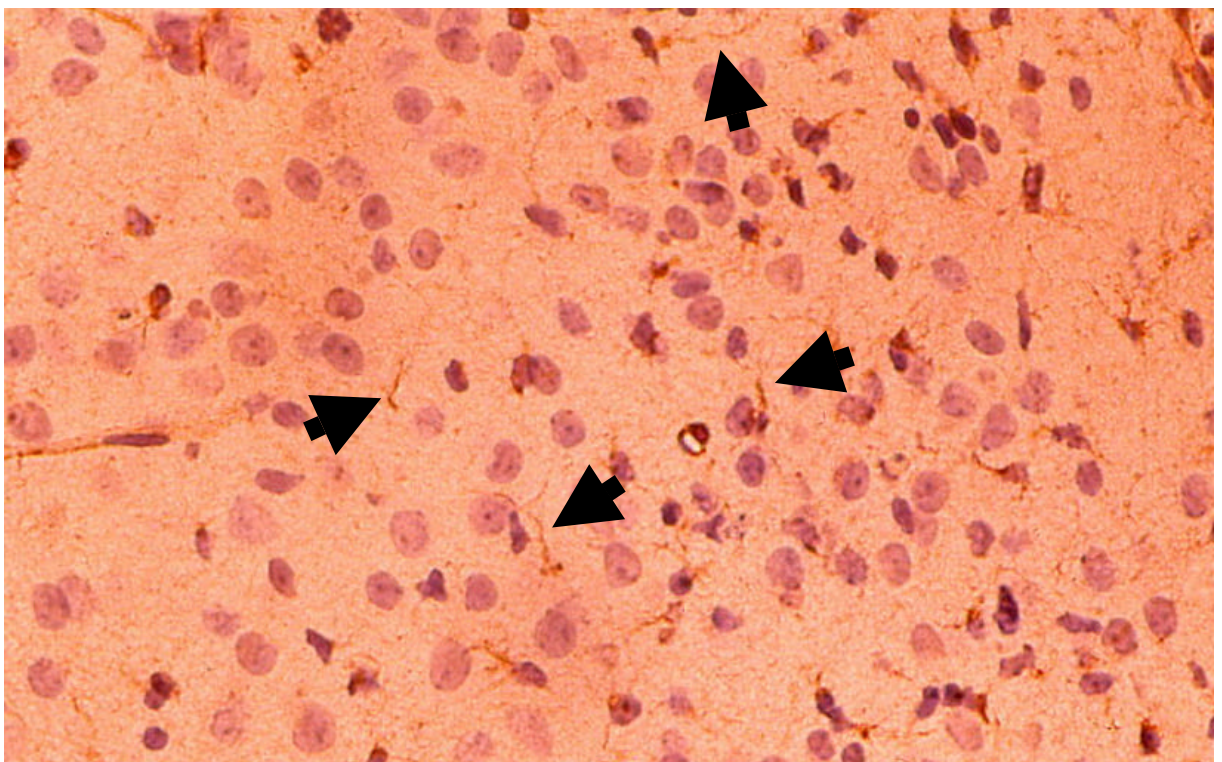


Abbildung 20:

Immunhistochemische Färbung mit iNOS-Antikörper im medialen septalen Nucleus (MSN) der 7 Tage alten Ratte (die Pfeile zeigen auf iNOS-positive Mikrogliä; Vergrößerung 400x)

3.2.2.2. Nitrotyrosin

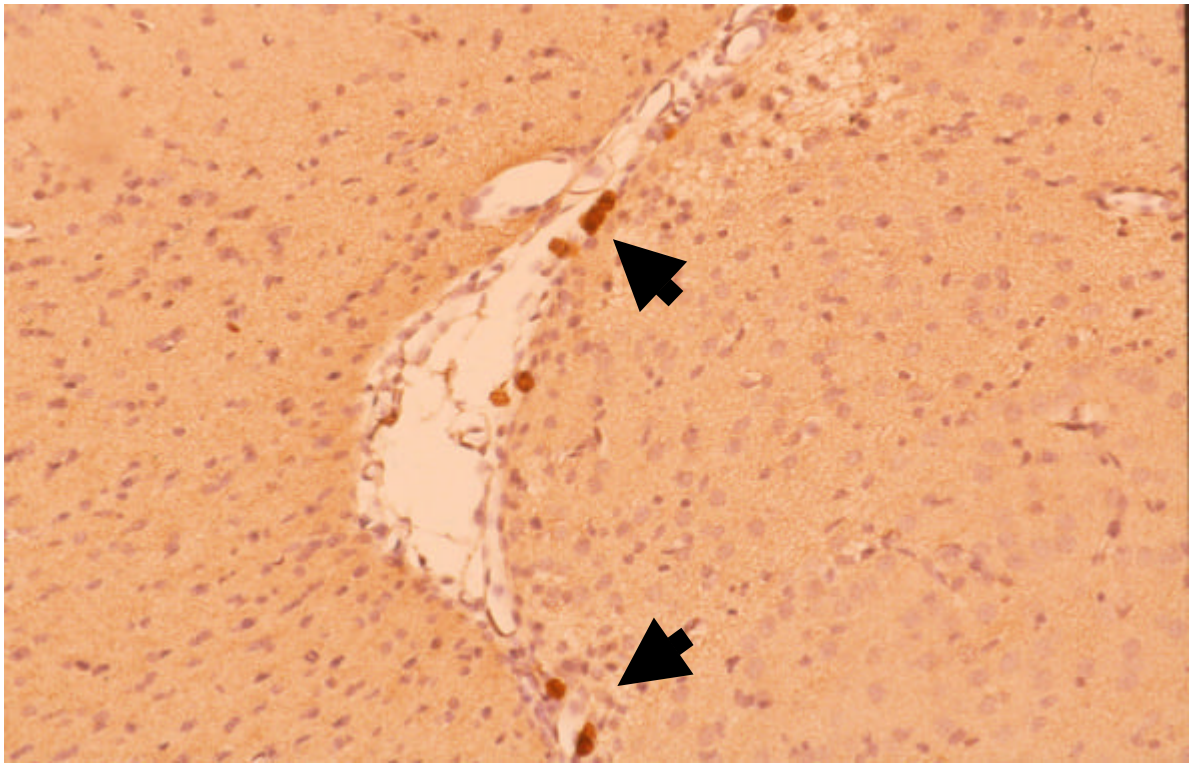


Abbildung 21:

Immunhistochemische Färbung mit Nitrotyrosin-Antikörper in der CA3-Region des Hippocampus nach Hyperoxieexposition der 7 Tage alten Ratte (Vergrößerung 200x). Spezifische Anfärbung für Nitrotyrosin zeigt sich nur in nicht-residenten Makrophagen, nicht aber in Neuronen, Mikrogliazellen oder perivaskulären Endothelzellen.

In sämtlichen Gehirnregionen ließ sich kein Unterschied zwischen Kontrollen und Hyperoxie-exponierten Tieren finden. Die einzigen Zellen, die sich mit Nitrotyrosin-Antikörper als Ausdruck der Peroxynitritproduktion färben ließen, waren nicht-residente Makrophagen (Abbildung 21).

3.2.3. iNOS-Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Bei 7 Tage alten Tieren zeigte die RT-PCR eine Expression von iNOS-mRNA in Abhängigkeit von der Dauer der Sauerstoffexposition. Während bei den Kontrollen keine Bande für iNOS-mRNA nachweisbar war, konnte nach 12 Stunden bei mehr als 80% Sauerstoff bereits ein deutliches Signal reproduziert werden (Abbildungen 22 und 23). Nach insgesamt 24 Stunden Sauerstoffexposition kam zu einer weiteren Intensitätszunahme des iNOS-mRNA-Signals, während das 'housekeeping gene' gleichmäßig exprimiert wurde.

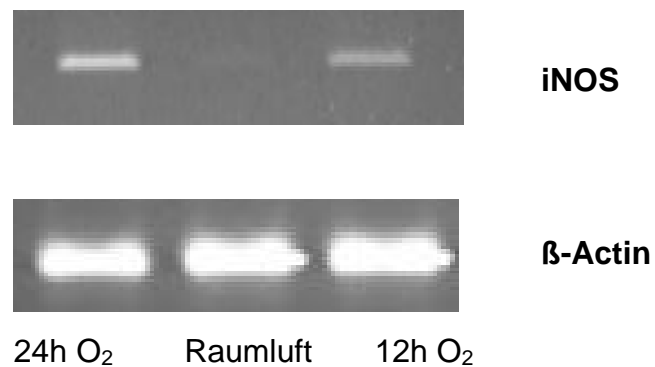


Abbildung 22:

iNOS-mRNA im Vergleich der Konditionen 24h Sauerstoff, Raumluft und 12h Sauerstoffexposition (oberer Abschnitt) und Expression des internen Standardgens β -Actin (unterer Abschnitt)

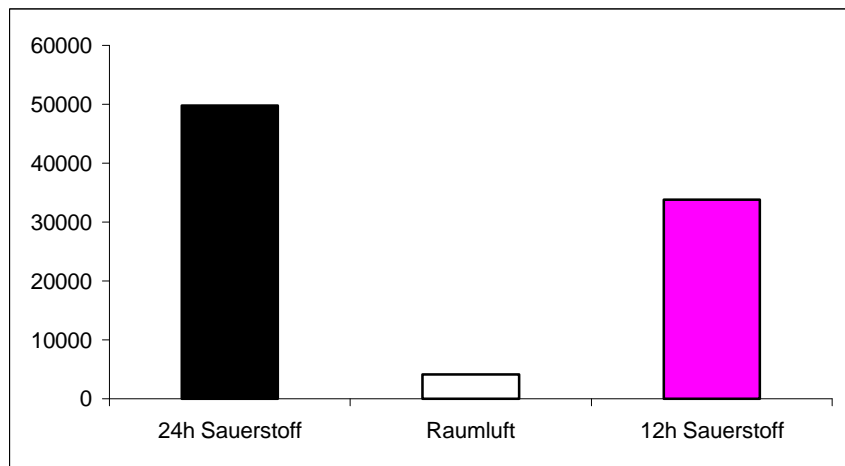


Abbildung 23:

iNOS-mRNA im Vergleich der Konditionen 24h Sauerstoff, Raumluft und 12h Sauerstoffexposition (arbiträre Einheiten bei der Auswertung der optischen Dichte der PCR-Banden)

3.3. Sauerstoffkonzentration und Aktivierungsverhalten von Granulozyten

3.3.1. Nabelschnurblut

3.3.1.1. Blutgasparameter

Die Äquilibration führte erwartungsgemäß zu deutlich unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken entsprechend der verwendeten Sauerstoffkonzentration (Abbildung 24). Nach 24stündiger Inkubation war dieser Unterschied nicht mehr vorhanden.

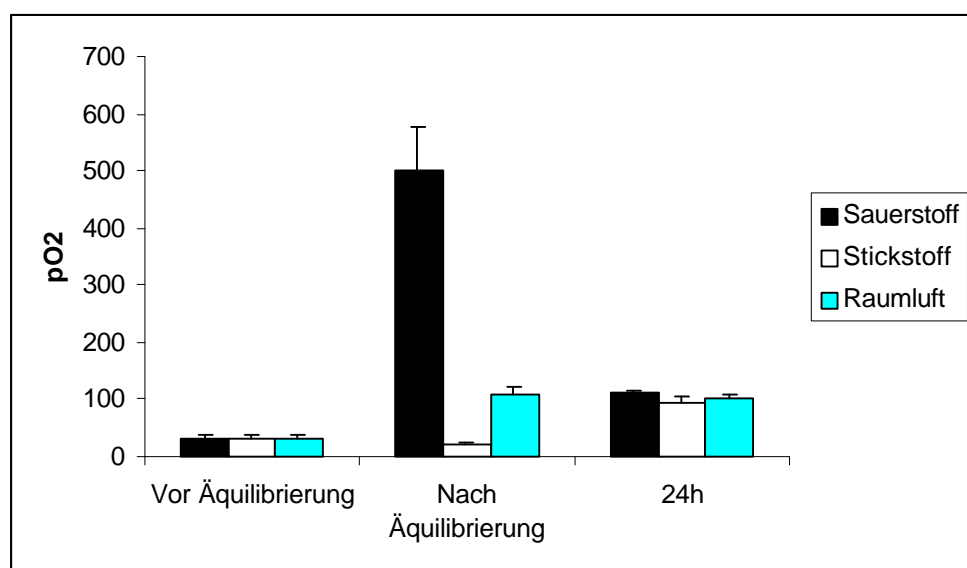


Abbildung 24:

Sauerstoffpartialdruck [mmHg] in den Nabelschnurproben vor und nach Äquilibration und nach Inkubation für 24h für die drei Sauerstoffkonzentrationen 0%, 21% und 100% (n=7)

3.3.1.2. L-Selectin

Die Ausgangswerte der L-Selectin-Expression lagen im Nabelschnurblut signifikant unterhalb derer im Erwachsenenblut ($p < 0.001$, Mann-Whitney U-Test). Im Verlauf des Experiments zeigte sich eine kontinuierliche Verminderung der Expression, Sauerstoff verursachte zu allen Zeitpunkten die stärkste Verminderung der Expression von L-Selectin im Nabelschnurblut ($p < 0.002$, Friedman; siehe Abbildung 25).

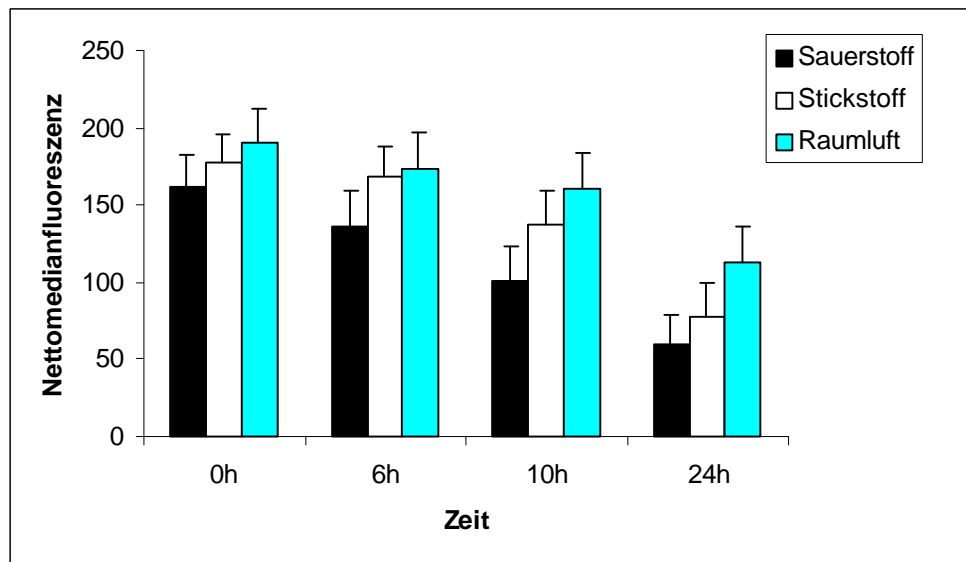


Abbildung 25:

Nettomedianfluoreszenz [arbiträre Einheit] der L-Selectin-Expression in Nabelschnurproben zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 10h und 24h für die drei Konditionen Sauerstoff, Stickstoff und Raumluft (n=7)

3.3.1.3. Propidiumjodid

Der Anteil von Propidiumjodid-positiven Zellen lag zu Beginn der Versuche in den Raumluftproben bei 1.1% und nahm im weiteren Verlauf bis auf 17.56% kontinuierlich zu. Dieser Wert war zwar deutlich höher als der entsprechende Meßwert im Erwachsenenblut, der Unterschied war aber nicht statistisch signifikant. Kein Unterschied bezüglich der Anzahl der avitalen Zellen fand sich im Vergleich der drei Sauerstoffkonzentrationen (Tabelle 2).

Tabelle 2:

Prozentualer Anteil der Propidium-positiven Zellen im Nabelschnurblut zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 10h und 24h; jeweils Mittelwert und SEM (n=7)

Nabelschnurblut			
	Sauerstoff	Stickstoff	Raumluft
0h	1.43 ± 0.14	1.61 ± 0.35	1.11 ± 0.05
6h	2.1 ± 0.53	2.27 ± 0.43	2.43 ± 0.73
10h	5.83 ± 1.94	4.27 ± 1.79	4.91 ± 1.84
24h	15.61 ± 3.53	19.31 ± 6.13	17.56 ± 4.53

3.3.2. Erwachsenenblut

3.3.2.1. Blutgasparameter

Auch in den Erwachsenenblutproben zeigte sich ein deutlicher Effekt der Äquilibration je nach verwendeter Sauerstoffkonzentration. Trotz Verwendung luftdichter Verschlussmaterialien war am Ende der 24stündigen Inkubation kein Unterschied im Sauerstoffpartialdruck mehr nachweisbar (Abbildung 26).

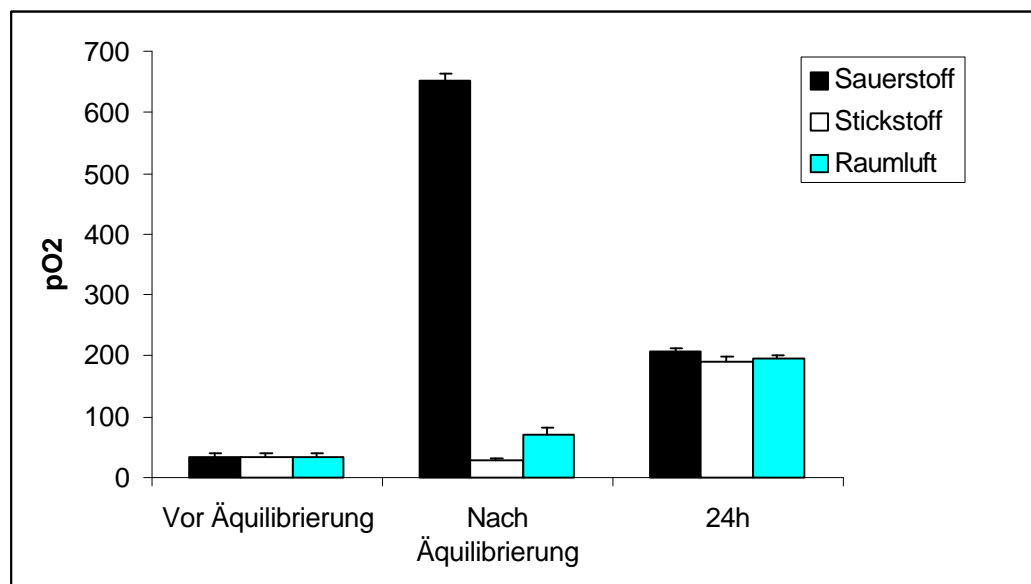


Abbildung 26:

Sauerstoffpartialdruck [mmHg] in den Nabelschnurproben vor und nach Äquilibration und nach Inkubation für 24h für die drei Sauerstoffkonzentrationen 0%, 21% und 100% (n=6)

3.3.2.2. *L-Selectin*

Erwachsenenblut zeigte signifikant höhere Ausgangswerte der L-Selectin-Expression im Vergleich zum Nabelschnurblut ($p < 0.001$, Mann-Whitney U-Test). Auch im Erwachsenenblut kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der L-Selectin-Expression über die Zeit, hier allerdings war die Äquilibration mit Stickstoff (i.e. Hypoxie) der stärkste Stimulus. Nach 24ständiger Inkubation liegen die Nettomedianfluoreszenzen signifikant unterhalb derer der Nabelschnurwerte ($p < 0.001$, Mann-Whitney U-Test, Abbildung 27).

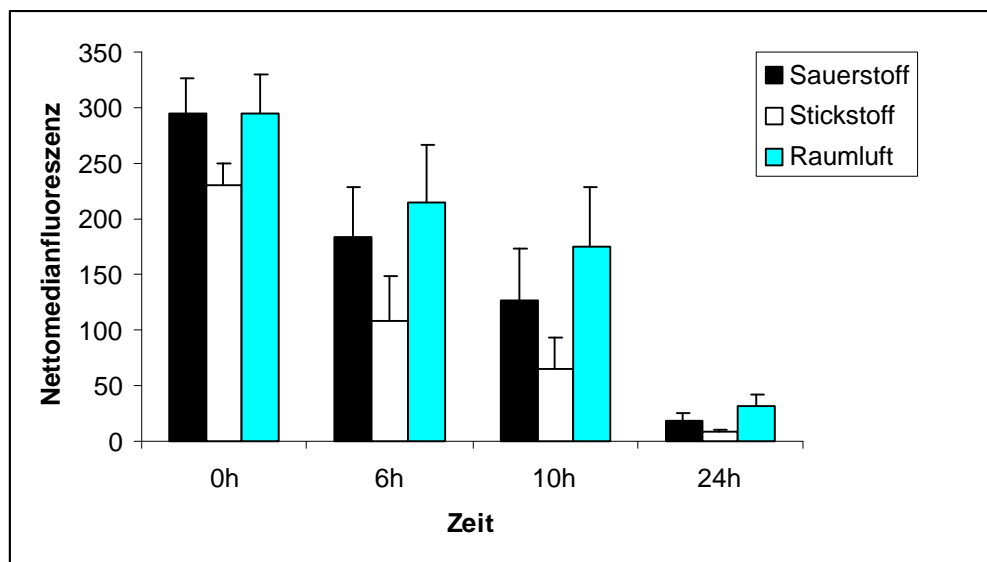


Abbildung 27:

Nettomedianfluoreszenz [arbiträre Einheit] der L-Selectin-Expression in Erwachsenenblutproben zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 10h und 24h für die drei Konditionen Sauerstoff, Stickstoff und Raumluft (n=6)

3.3.2.3. *Propidiumjodid*

Von niedrigen Ausgangswerten nahm die Anzahl avitaler Zellen kontinuierlich zu, das Maximum war nach 24h in den Sauerstoff-exponierten Proben erreicht (Tabelle 3). Die verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen unterschieden sich zum gleichen Zeitpunkt nicht bezüglich der Anzahl der Propidiumjodid-positiven Zellen.

Tabelle 3:

Prozentualer Anteil der Propidium-positiven Zellen im Erwachsenenblut zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 10h und 24h; jeweils Mittelwert und SEM (n=6)

Erwachsenenblut			
	Sauerstoff	Stickstoff	Raumluft
0h	1.85 ± 0.27	1.32 ± 0.14	2.7 ± 0.94
6h	3.12 ± 0.68	3.22 ± 0.63	4.53 ± 1.8
10h	6.45 ± 3.12	3.62 ± 0.83	2.9 ± 0.51
24h	12.03 ± 2.5	8.95 ± 0.97	6.73 ± 1.18

4. Diskussion

4.1. Bakteriostatischer Effekt von NO

Für zwei der fünf untersuchten Spezies (*S. epidermidis* und *S. agalactiae*) liess sich eine signifikante Reduktion der Anzahl von CFU's bei NO-Konzentrationen bis 120ppm nachweisen. Andere Untersucher konnten einen bakteriostatischen Effekt von NO auf *S. aureus*-Kulturen bereits bei Dosierungen von 1ppm zeigen [Mancinelli 1983]. Diese Wirkung ging bei höheren NO-Konzentrationen ($\leq 1.9\text{ppm}$) wieder verloren, parallel kam es zu einem Anstieg der NO_2 -Konzentration. Der Hypothese der Autoren zufolge verhindern höhere NO_2 -Konzentrationen einen bakteriostatischen Effekt von NO in höheren Konzentrationen. Mancinelli und McKay untersuchten auch den pH-Wert ihres Bakterienmediums und fanden bei NO_2 -Werten bis 5.5ppm keinerlei Veränderungen des pH. Dies wäre durchaus zu erwarten gewesen, da NO_2 und Wasser zu Reaktionsprodukten reagieren, die toxisch für Bakterien sind. Für unsere Untersuchung waren diese Daten insofern von Bedeutung, als unsere maximal gemessene NO_2 -Konzentration bei exakt diesen 5.5ppm lagen, die bereits von Mancinelli untersucht waren. In unserem experimentellen Design hatten wir darauf geachtet, Höchstwerte für NO_2 nicht zu überschreiten. Die Bildung von NO_2 ist von der zur Verfügung stehenden Reaktionszeit von NO und

Sauerstoff abhängig [Weinberger 2001]. Deshalb war es für unsere Untersuchung entscheidend, einerseits dafür zu sorgen mittels eines ausreichenden Gasflusses die NO₂-Bildung zu minimieren, andererseits zu verhindern, dass bei hohem Gasfluss die Kulturen austrocknen (für Details siehe Tabelle 1).

NO-Konzentrationen, wie sie in den frühen klinischen Studien beim Neugeborenen verwendet wurden, lagen in einem Bereich von 6 bis 80ppm [Roberts 1997, NINOS 1997]. Der Grund für die Testung von 120ppm NO in unserer Untersuchung war das Ergebnis von Vorversuchen, das signifikante bakteriostatische Effekte im Bereich zwischen 80 und 120ppm erwarten ließ.

Das Wachstum von *S. aureus* war bei allen drei NO-Konzentrationen (40, 80 und 120ppm) nicht beeinträchtigt. Cunha et al. haben Mausmakrophagen mit formalinbehandelten *S. aureus* aktiviert und die NOS-Expression und Nitritbildung mit und ohne Zugabe von IFN- γ gemessen [Cunha 1993a, b]. Dabei zeigte sich eine deutliche Expression von NOS, die durch Zugabe von IFN- γ noch verstärkt werden konnte. Die endogene Immunabwehr von Körperzellen, die sich einer oxidativen Schädigung mittels hoher iNOS-induzierter Stickstoffmonoxidkonzentrationen bedient, resultiert in NO-Konzentrationen die um den Faktor 10³ über diejenigen liegen, die die konstitutiven NOS produzieren [Moncada 1992]. Wir gehen davon aus, dass unsere *in-vitro* erreichten NO-Konzentrationen nicht hoch genug waren um den *in-vivo* postulierten Effekt einer massiven oxidativen Schädigung zu erreichen. Möglicherweise existiert auch für *S. aureus* eine Art von Schutzmechanismus, der den Anstieg des Wachstums in der niedrigen Inokulumgruppe erklärt. Hinweise in der publizierten Literatur fanden sich hierfür allerdings keine.

Von *S. epidermidis* ist bekannt, dass dieser Erreger vorzugsweise auf der Oberfläche von Fremdkörpern wächst [Rupp 1999]. Diese Bakterienart besitzt eine Schutzschicht aus Glykokalyx, die sowohl die Chemotaxis von Phagozyten, als auch von Phytohämagglutinin, die Proliferation von T-Zellen und den oxidativen Burst verhindert [Ferguson 1992, Eng 1995]. Nach einer Aktivierung von Makrophagen durch die Glykokalyx von *S. epidermidis* konnte ein Anstieg von TNF- α , IL-1 α und von Prostaglandin E₂ gezeigt werden, während erhöhte Nitritkonzentrationen erst nach Zugabe von IFN- γ nachgewiesen werden konnten [Stout 1994]. Mit hitze-inaktivierten *S. epidermidis*-Isolaten ließ sich eine

Basisproduktion von NO in Makrophagen erzielen, die durch die Zugabe von IFN- γ signifikant gesteigert werden konnte [Goodrum 1994]. Obwohl eine Reihe von Substanzen bekannt sind, die zu einer Hochregulation von iNOS führen [Cunha 1993b, Minc-Golomb 1996, Derrico 1996], so ist doch unklar, zu welchen NO-Konzentrationen die iNOS-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid auf zellulärer Ebene führt. *In-vitro* fanden wir keinen Effekt bei 40 und 80ppm, dagegen eine signifikante Reduktion des bakteriellen Wachstums von *S. epidermidis* bei 120ppm. Dieser Effekt ließ sich in beiden Inokula nachweisen und läßt darauf schließen, dass die für *S. epidermidis* bakteriostatisch wirksame Konzentration von NO zwischen 80 und 120ppm liegt.

S. agalactiae (GBS) ist der am häufigsten isolierte Erreger neonataler Meningitiden, Pneumonien und Septitiden [Bromberger 2000]. Die Aktivierung von Makrophagen mittels hitzeinaktivierter *S. agalactiae* führte zur Produktion von Nitrat, welches den Abbau von NO nahelegt. Diese Produktion konnte durch den Zusatz von IFN- γ noch weiter gesteigert werden [Goodrum 1995]. Ein bakteriostatischer Effekt fand sich in unserem *in-vitro*-Modell bei *S. agalactiae* nur in der kleineren Inokulumgruppe bei 120ppm NO, auch bei dieser Spezies scheint die zur Reduktion bakteriellen Wachstums wirksame Konzentration zwischen 80 und 120ppm zu liegen.

Die Bakterienwand von *E. coli* besteht zu einem definierten Teil aus Lipopolysacchariden, die zu den potentesten Aktivatoren von Makrophagen zumindest von Nagetieren zählen [Martin 1995]. Auch bei *E. coli* führt die Zugabe von IFN- γ zu einer vermehrten Produktion von Stickstoffmonoxid. Bei den niedrigen Konzentrationen von NO (40 und 80ppm) zeigte sich kein Unterschied zwischen NO-Exposition und Raumluftbegasung. In der 120ppm-Population jedoch war das Wachstum in der NO-Gruppe deutlich (aber nicht statistisch signifikant) vermehrt, dies nur im kleineren Inokulum. Möglicherweise ist dieser Effekt Ausdruck eines *E. coli*-spezifischen antioxidativen Schutzmechanismus auch genannt '*E. coli* superoxide stress regulon system' [Nunoshiba 1995, Vasileva 2001]. Dieses System kombiniert antioxidative Mechanismen wie die Superoxiddismutase und ein DNA-Reparaturenzym zur Behebung oxidativer Schädigung und schützt *E. coli* so vor der Zytotoxizität von NO-produzierenden Makrophagen. Die Produkte dieses 'stress regulon'-Gens sind unter anderen eine

Mangan-enthaltende Superoxiddismutase, das oxidative DNA-Reparationsenzym Endonuklease IV, Glukose-6-phosphatdehydrogenase, die micF-kodierte antisense RNA [Chou 1993], die Fumarase [Liochev 1992] und die NADPH:Ferredoxinoxidoreduktase [Liochev 1994]. Diese spezifische Protektion vor oxidativer Schädigung könnte für das unveränderte bzw. sogar vermehrte Wachstum von *E. coli* in unserem Versuchsdesign verantwortlich sein.

Das Wachstum von *P. aeruginosa* war bei allen NO-Konzentrationen unverändert. Durch Vorbehandlung mit IFN- γ oder TNF- α konnte dosisabhängig in einem Mausmodell sowohl eine vermehrte Aufnahme als auch ein schnelleres Abtöten von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden [Pierangeli 1993]. Für beide Zytokine ist gut belegt, dass sie zu einer vermehrten Expression von iNOS führen und so die intrazelluläre Konzentration von NO erhöhen [Mancinelli 1983]. Bisher existieren keine verlässlichen Angaben zur tatsächlichen Höhe intrazellulärer NO-Konzentrationen. Aufgrund des Wachstumsverhaltens von *P. aeruginosa* müssen wir jedoch davon ausgehen, dass auch bei 120ppm keine für diese Spezies bakteriostatischen Konzentrationen von NO erreicht wurden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich ableiten, dass NO einen selektiv bakteriostatischen Effekt auf einige, der am häufigsten aus trachealen Kulturen beatmeter Früh- und Neugeborener, isolierte Erreger besitzt. Dieser Effekt ist dosisabhängig und beginnt in einem Dosierungsbereich (80-120ppm), der heute klinisch nicht mehr zum Einsatz kommt. In den derzeitig verwendeten Dosierungen (≤ 20 ppm bis maximal 40ppm) ist nicht von einem bakteriostatischen Effekt von NO auszugehen. Die Wachstumscharakteristika von Bakterien *in-vivo* sind möglicherweise weit komplexer und unterscheiden sich durch das Vorliegen Spezies-spezifischer Regulation antioxidativer Schutzmechanismen.

4.2. Sauerstoffinduzierte, zerebrale Schädigung durch iNOS-Hochregulation

Hyperoxie-Exposition führte bei unreifen Ratten im postnatalen Alter von bis zu 7 Tagen zu einer ubiquitären, zerebralen Hochregulation von iNOS. Dieser Effekt war bei den Kontrolltieren nicht nachweisbar. Zu den Gehirnregionen mit der ausgeprägtesten Expression von iNOS gehörten der Hippocampus (CA-1), der

frontale Kortex (primärer und sekundärer Motorkortex) und der retrospleniale Kortex. In diesen Arealen war die iNOS-Expression auf Mikrogliazellen und perivaskuläre Endothelzellen beschränkt.

Der Nachweis einer konstitutiven NO-Produktion in der CA-1-Region des Hippocampus und im Kortex von adulten Ratten konnte *in-vivo* mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs DAF-2 DA in einem Slicemodell geführt werden [Kojima 1998]. Die zerebrale Synthese von NO durch die induzierbare NOS ist bisher nur für inflammatorische Konditionen gezeigt worden, bei denen es zu einer Ausschüttung von TNF- α , IL-1 β bzw. von IFN- γ kommt [Akama 2000, Wakita 2001]. Die resultierende iNOS-Expression unter inflammatorischen Konditionen wurde sowohl in Astrozyten [Kolker 2001], als auch in aktivierter Mikroglia gezeigt [Heneka 2000].

Die Rolle der iNOS-Expression im Gehirn ist hinsichtlich ihrer Bedeutung als Schutz- oder Schädigungsmechanismus weit von einer Klärung entfernt. So fanden Untersucher in einem Traumamodell der adulten Ratte einen protektiven Effekt endogen produzierten Stickstoffmonoxids, während eine Inhibition von iNOS mittels selektiver Antagonisten oder der Einsatz von iNOS-knock-out-Mäusen (*iNOS*^{-/-}) zu einer vermehrten histopathologischen Schädigung und einem reduzierten neurologischen Outcome führten [Sinz 1999]. Andere Autoren konnten eine direkte Kaskade von der initialen Hochregulation von iNOS bis zur Caspasen-vermittelten Apoptose der Zielzelle darstellen, wobei das Ausmaß der apoptotischen Veränderungen eine Funktion der beteiligten pro- und antiapoptotischen Metaboliten darstellte [Brüne 1998]. Zusätzlich ist bekannt, dass NO nicht nur proapoptotische Mechanismen in bestimmten Systemen triggern kann [Leist 1997a, Leist 1997b, Bonfoco 1995, Bonfoco 1996], sondern auch Apoptose in Neuronen [Tenneti 1997, Estevez 1998] und in anderen Zellen verhindern kann [Bohlinger 1995, Mannick 1994, Kim 1997]. Dabei sind die Wirkmechanismen von NO in Abhängigkeit vom betroffenen Zelltyp und dem eingeschlagenen Stoffwechselweg des Zelltodes unterschiedlich. In bestimmten Zellen kann Stickstoffmonoxid die Exekution der Apoptose durch Inhibition aktiver Caspasen mittels S-Nitrosylierung verhindern [Tenneti 1997, Kim 1997], in wieder anderen durch Verhinderung der Caspasenaktivierung über eine cGMP-vermittelte Reaktion [Estevez 1998, Kim 1997]. Für die Determinierung der Todesform einer

Zelle (Apoptose versus Nekrose) scheint nicht nur der akute Triggerreiz eine Rolle zu spielen, sondern auch der aktuelle Energiezustand der Zelle [Nicotera 1999]. Im Falle unseres Tiermodells konnten wir sowohl eine Hochregulation von iNOS als auch eine deutlich über das normale, neonatale Maß hinausgehende Apoptose von Neuronen zeigen. Obwohl damit noch keine Kausalkette etabliert ist, legt es damit den Schluss nahe, dass hohe Konzentrationen von NO (iNOS-vermittelt) eher negative Folgen für unterschiedlichste Zellsysteme haben, während niedrige Stickstoffmonoxidkonzentrationen (eNOS- oder nNOS-vermittelt) eher protektiv wirken können [Estevez 1998]. Wichtig für die Konzeption zellprotektiver Strategien scheint vor allem zu sein, dass die alleinige Unterbrechung einer Todeskaskade, die für die apoptotische Morphologie verantwortlich ist, nicht unbedingt zu einem Überleben der Zellen führt; häufig wechselt in diesen Fällen lediglich die Natur des Zelltods von der Apoptose zur Nekrose [Leist 1997, Melino 1997, Hirsch 1997, Green 1998].

Im vorliegenden Modell ließ sich die Hypothese, daß als Ausdruck der schädigenden Wirkung großer Mengen freigesetzten Stickstoffmonoxids auch Peroxynitrit entstehen würde, nicht bestätigen. Damit unterscheidet sich unser Modell von dem Inflammationsmodell anderer Untersucher, die bei LPS-Behandlung selbst bei niedrigen iNOS-Konzentrationen bereits die Synthese von Peroxynitrit nachweisen konnten [Javeshghani 2001]. In einem Modell der chronischen Hypoxie führten selbst niedrige, durch endotheliale NOS katalysierte, Mengen von NO zu einem positiven Nachweis von Nitrotyrosin als Marker für Peroxynitrit [Demiryürek 2000]. Wir können aus den vorliegenden Daten nur folgern, daß ausreichende antioxidative Schutzmechanismen vorhanden sein müssen, die eine substantielle Bildung von Peroxynitrit *in-vivo* verhindern.

4.3. Aktivierungsverhalten von Granulozyten

Die vorliegende Studie zeigt, dass eine Veränderung des Sauerstoffpartialdrucks ausreichend ist, um eine Aktivierung polymorphonukleärer Leukozyten zu erreichen. Das Ausmaß der Aktivierung wurde anhand der Herunterregulation der

L-Selectin-Expression quantifiziert. Unterschiede ergaben sich im Aktivierungsmuster zwischen Nabelschnurblut-PMN und adulten PMN. Dabei zeigte sich, dass Hypoxie der stärkste Stimulus für die Aktivierung adulter PMN war, während Nabelschnur-PMN am empfindlichsten auf Hyperoxie reagierten. Die Herunterregulation von L-Selectin begann sehr früh nach der Äquilibration und war nicht Zelltod-assoziiert. Letzteres ließ sich anhand der Aufnahme von Propidiumjodid zeigen, die erst zu späteren Zeitpunkten zu verzeichnen war. Diese Studie bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen, wonach Nabelschnur-PMN reifer Neugeborener eine gegenüber adulten PMN reduzierte L-Selectin-Expression besitzen [Bührer 1994, Anderson 1991, Török 1993, Fortenberry 1994]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß des L-Selectin-Shedding beim Neugeborenen-PMN gegenüber dem Erwachsenen-PMN verringert ist. Dies gilt nicht nur für die Reaktion des PMN gegenüber bakteriellen Peptiden und anderen Mediatoren der Inflammation [Rebuck 1995, Koenig 1996], sondern auch für eine Variation des Sauerstoffpartialdrucks. Es wird davon ausgegangen, dass eine niedrige L-Selectin-Expression mit einer Beeinträchtigung der L-Selectin-abhängigen Adhäsion von PMN an immobilisierte Thrombozyten, Leukozyten und an entzündlich verändertes Endothel der Gefäßwand verbunden ist [Anderson 1991, Fortenberry 1994]. Während dies Neugeborene für Infektionen aller Art prädisponieren mag, so legt doch die Konservierung der postnatalen L-Selectin-Reduktion einen evolutionstechnischen Vorteil beim Bewältigen der nicht unerheblichen Veränderungen von Temperatur, Gasaustausch und Kreislauf nahe [Anderson 1991, Fortenberry 1994]. Experimentelle Inhibition der L-Selectin-Funktionen durch monoklonale Antikörper oder Selektinchimären führte sowohl zu reduzierter lokaler und entfernter Gewebsschädigung infolge Ischämie und Reperfusion [Seekamp 1994] als auch zu einer Attenuierung Sepsis-induzierter Lungenschädigung [Ridings 1995]. Interessanterweise gleichen die Reaktionsmuster von Nabelschnur-PMN sehr unreifer Frühgeborener wieder denen Erwachsener [Bührer 1994, Smith 1993] und haben demzufolge möglicherweise ein höheres Risiko, aberrante inflammatorische Prozesse aufrecht zu erhalten.

Vor der Geburt sind fetale PMN an niedrige Sauerstoffspannungen adaptiert und sind wahrscheinlich deshalb gegenüber Sauerstoffmangelzuständen unmittelbar nach der Geburt relativ resistent. Dies konnte an Nabelschnur-PMN von

Neugeborenen gezeigt werden, die perinatal eine Asphyxie durchgemacht hatten [Bührer 1994]. Im Gegensatz hierzu scheint eine Hyperoxie eine inflammatorische Aktivierung von neonatalen PMN zu bewirken. Während bei Frühgeborenen das Risiko einer Retinopathie des Frühgeborenen den allzu sorglosen Umgang mit Sauerstoff restringiert, wird bei reifen Neugeborenen eher großzügig mit Sauerstoff umgegangen. Dies wird durch die Neufassung der Reanimationsrichtlinien für Neugeborene zusätzlich gefördert, da das gerade erschienen Konsensuspapier die Verwendung von 100% Sauerstoff geradezu zwingend vorschreibt [Niermeyer 2000]. Hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen können inflammatorische Dysregulationen bei Neugeborenen verstärken. Sowohl bei Kindern, die sich einer extrakorporalen Membranoxygenierung unterziehen mußten als auch bei ehemaligen Frühgeborenen mit chronischer Lungenerkrankung konnte eine vermehrte PMN-Aktivierung anhand einer Zunahme des L-Selectin-Shedding nachgewiesen werden [Fortenberry 1996, Kotecha 1998]. Da PMN frei durch den gesamten Organismus zirkulieren, kann eine PMN-Aktivierung auch andere Organsysteme wie Gehirn oder Darm betreffen [Hirsch 1998, Leviton 1999]. Zusätzlich zum Effekt der PMN-Aktivierung kann Hyperoxie bei Neutrophilen auch eine verstärkte Wasserstoffperoxidproduktion verursachen [Suzuki 1997].

Aus diesen Beobachtungen wird gefolgert, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen zu einer Aktivierung von Nabelschnur-PMN führt. Diese Aktivierung könnte auch an entfernten Organsystemen zu schädlichen Veränderungen führen. Im Gegensatz zu Nabelschnur-PMN sind adulte PMN vermehrt durch Hypoxie aktivierbar. Wir spekulieren, dass die Hyperoxie-induzierten unspezifischen Aktivierungsvorgänge von PMN einen restriktiven Umgang mit hohen Sauerstoffkonzentrationen bei Neugeborenen rechtfertigen.

5. Zusammenfassung

Die fünf häufigsten tracheal isolierten Erreger im Patientenkollektiv einer Früh- und Neugeborenenintensivstation wurden auf die Beeinflussbarkeit ihres bakteriellen Wachstums untersucht (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Jeweils zehn verschiedene Stämme wurden für 24 Stunden bei Stickstoffmonoxidkonzentrationen von 40, 80 oder 120ppm inkubiert, anschließend die Anzahl der Kolonie-formenden Einheiten (CFU) quantifiziert. Es fand sich eine signifikante Reduktion des Wachstums von *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus agalactiae*, diese bakteriostatische Wirkung setzte erst im hohen Dosierungsbereich (120ppm) ein.

Neugeborene Wistar-Ratten wurden im Alter von 1, 3 bzw. 7 Tagen für 24 Stunden Hyperoxie-exponiert, anschließend die Gehirne perfusionsfixiert. Untersucht wurde auf das Vorhandensein apoptotischer Veränderungen, zusätzlich immunhistochemisch auf iNOS- und Nitrotyrosin und mittels RT-PCR auf Veränderungen im Expressionsmuster von iNOS. In allen drei Altersgruppen fand sich eine ubiquitäre Hochregulation von iNOS-Protein, am stärksten ausgeprägt bei 7 Tage alten Tieren. Die Dauer der Hyperoxieexposition zeigte eine positive Korrelation zur iNOS-mRNA-Menge in der Polymerasekettenreaktion. Auf zellulärer Ebene fand diese Expression überwiegend in Mikrogliazellen (den Abwehrzellen des Gehirns) statt, zusätzlich zeigten auch vaskuläre Endothelzellen eine vermehrte Expression von iNOS. Eine vermehrte Synthese von Nitrotyrosin ließ sich in keiner der drei Altersgruppen nachweisen. Die Tatsache, dass trotz Hochregulation von iNOS kein Nitrotyrosin entsteht, legt die Existenz von Schutzmechanismen nahe, die selbst bei den unreifsten Ratten im Alter von einem Tag suffizient erscheinen.

In einem *in-vitro*-Modell wurde Nabelschnurblut reifer Neugeborener und peripher venöses Blut adulter Probanden für 30 Minuten mit Sauerstoffkonzentrationen von 0%, 21% und 100% äquilibriert. Zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 10h und 24h wurde die Expression von L-Selectin als Marker der Leukozytenaktivierung flowzytometrisch quantifiziert. Als Indikator fehlender Viabilität der Zellen wurde parallel die Propidiumjodidaufnahme in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die

Potenz der Trigger einer Leukozytenaktivierung unterschied sich zwischen Nabelschnurblut und adultem Blut: während Hypoxie im adulten Blut die stärkste Expression von L-Selectin bewirkte, war Hyperoxie bei Nabelschnurblutproben der potenteste Initiator der Leukozytenaktivierung.

In der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen vorgestellt, die sich mit Wirkungen und Interaktionen von zwei ubiquitär im menschlichen Körper vorkommenden Gasen befassen, i.e. Sauerstoff und Stickstoffmonoxid. Im Falle beider Substanzen ermöglicht die geringe Größe der Moleküle eine freie Diffusion über Membranen hinweg, eine Eigenschaft, die für die Funktion der Signaltransduktion geradezu prädestiniert. Aus den vorgelegten Untersuchungen lassen sich die folgenden Folgerungen ableiten:

- Stickstoffmonoxid wirkt *in-vitro* selektiv bakteriostatisch auf Bakterien, die üblicherweise Früh- und Neugeborene besiedeln. Dabei hängt die Selektivität von den jeweiligen bakteriellen Verteidigungsmechanismen ab, die bakteriostatische Wirkung liegt in einem Konzentrationsbereich, der außerhalb desjenigen liegt, der derzeit klinisch angewendet wird.
- Hyperoxie führt im Ganztiermodell der unreifen Ratte zu einer zerebralen Hochregulation von iNOS und damit zur Synthese von Stickstoffmonoxid. Soweit dies anhand der Entstehung von Peroxynitrit als definitivem Schädigungsmechanismus beurteilbar ist, wird trotz entsprechender iNOS-Expression wenig bis gar kein Peroxynitrit gebildet. Da das Zusammentreffen von NO und Sauerstoff sonst regelhaft zur Entstehung von Peroxynitrit führt, müssen im Gehirn der unreifen Ratte ausreichende antioxidative Schutzmechanismen präsent sein, die diese Reaktion verhindern.
- Im *in-vitro*-Modell der Gasäquilibrierung von Nabelschnur-PMN zeigte sich unter Hyperoxie das ausgeprägteste Aktivierungsmuster aller verglichenen Sauerstoffkonzentrationen. Dies stand im Gegensatz zur Exposition adulter Zellen, hier fand sich eine größere Hyperoxietoleranz bei gleichzeitig stärkster Aktivierung unter Hypoxiebedingungen. Welche Bedeutung diesen Ergebnissen im klinischen Umgang mit Neugeborenen zukommt muß derzeit noch offen bleiben. Allerdings häufen sich Hinweise aus experimentellen Studien, die darauf hindeuten, daß ein restriktiver Umgang mit hohen

Sauerstoffkonzentrationen auch im klinischen Umfeld gerechtfertigt sein könnte.

Literatur

1. Abman SH, Kinsella JP, Schaffer MS, Wilkening RB. Inhaled nitric oxide in the management of a premature newborn with severe respiratory distress and pulmonary hypertension. *Pediatrics* 1993;92:606-609
2. Ahdab-Barmada M, Moossy J, Nemoto EM, Lin MR. Hyperoxia produces neuronal necrosis in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986;45:233-46
3. Ahluwalia JS, Kelsall AW, Raine J, Rennie JM, Mahmood M, Oduro A, Latimer R, Pickett J, Higenbottam TW. Safety of inhaled nitric oxide in premature neonates. *Acta Paediatrica* 1994;83:347-348
4. Akama KT, Van Eldik LJ. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 β - and tumor necrosis factor- α (TNF α)-dependent, and involves a TNF α receptor-associated factor- and NF κ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem* 2000;275:7918-24
5. Anderson DC, Abbassi O, Kishimoto TK, Koenig JM, McIntire LV, Smith CW. Diminished lectin-, epidermal growth factor-, complement binding domain-cell adhesion molecule-1 on neonatal neutrophils underlies their impaired CD18-independent adhesion to endothelial cells in vitro. *J Immunol* 1991;146:3372-9
6. Änggård E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-1206
7. Appleby CJ, Towner RA. Magnetic resonance imaging of pulmonary damage in the term and premature rat neonate exposed to hyperoxia. *Pediatr Res* 2001; 50:502-7
8. Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10089-93
9. Barrington KJ, Finer NN. Inhaled nitric oxide for respiratory failure in preterm infants (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2001;4:CD000509
10. Bellamy TC, Wood J, Garthwaite J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:507-510
11. Benzing A, Beyer U, Kiefer P, Geiger K. Inhaled nitric monoxide. Application and continuous measurement of concentration. *Anaesthesist* 1993;42:175-8
12. Berg M, James SP. Human neutrophils release the Leu-8 lymph node homing receptor during cell activation. *Blood* 1990;76:2381-8
13. Bland RD. Special considerations in oxygen therapy of infants and children. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:45-54
14. Blomqvist H, Wickerts CJ, Andreen M, Ullberg U, Örtqvist Å, Frostell C. Enhanced pneumonia resolution by inhalation of nitric oxide? *Acta Anaesthesiol Scand* 1993;37:110-4
15. Bohlinger I, Leist M, Barsig J, Uhlig S, Tiegs G, Wendel A. Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor α -induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology* 1995;22:1829-37
16. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two

- distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7162-6
17. Bonfoco E, Leist M, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem* 1996;67:2484-93
 18. Bromberger P, Lawrence JM, Braun D, Saunders B, Contreras R, Petitti DB. The influence of intrapartum antibiotics on the clinical spectrum of early-onset group B streptococcal infection in term infants. *Pediatrics* 2000;106:244-50
 19. Brooks SE, Gu X, Samuel S, Marcus DM, Bartoli M, Huang PL, Caldwell RB. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:222-8
 20. Brosnan CF, Lee SC, Liu J. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in human glia: implications for inflammatory central nervous system diseases. *Biochem Soc Trans* 1997;25:679
 21. Brüne B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998;351:261-72
 22. Bühner C, Graulich J, Stibenz D, Dudenhausen JW, Obladen M. L-selectin is down-regulated in umbilical cord blood granulocytes and monocytes of newborn infants with acute bacterial infection. *Pediatr Res* 1994;36:799-804
 23. Chen Y, Whitney PL, Frank L. Comparative responses of premature versus full-term newborn rats to prolonged hyperoxia. *Pediatr Res* 1994;35:233-7
 24. Chou JH, Greenberg JT, Demple B. Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J Bacteriol* 1993;175:1026-31
 25. Coeroli L, Renolleau S, Arnaud S, Plotkine D, Cachin N, Plotkine M, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. Nitric oxide production and perivascular tyrosine nitration following focal ischemia in neonatal rat. *J Neurochem* 1998;70:2516-25
 26. Cross AR, Jones OTG. Enzyme mechanisms of superoxide production. *Biochem Biophys Acta* 1991;1057:281-298
 27. Cunha FQ, Assreuy J, Xu D, Charles I, Liew FY, Moncada S. Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 1993;23:1385-1388
 28. Cunha FQ, Moss DW, Leal LM, Moncada S, Liew FY. Induction of macrophage parasitocidal activity by *Staphylococcus aureus* and exotoxins through the nitric oxide synthesis pathway. *Immunology* 1993;78:563-7
 29. Davidson D, Barefield ES, Kattwinkel J et al. Inhaled nitric oxide for the early treatment of persistent pulmonary hypertension of the term newborn: a randomized, double-masked, placebo-controlled, dose-response, multicenter study. The I-NO/PPHN Study Group. *Pediatrics* 1998;101:325-34
 30. Demiryurek AT, Karamsetty MR, McPhaden AR, Wadsworth RM, Kane KA, MacLean MR. Accumulation of nitrotyrosine correlates with endothelial NO synthase in pulmonary resistance arteries during chronic hypoxia in the rat. *Pulm Pharmacol Ther* 2000;13:157-65
 31. Derrico CA, Goodrum KJ. Interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha mediate innate production of gamma interferon by group B *Streptococcus*-treated splenocytes of severe combined immunodeficiency mice. *Infect Immun* 1996;64:1314-20
 32. Emeis M, Sonntag J, Willam C, Strauss E, Walka MM, Obladen M. Acidosis activates

complement system in vitro. *Mediators Inflamm* 1998;7:417-20

33. Endo A, Ayusawa M, Minato M, Takada M, Takahashi S, Harada K. Endogenous nitric oxide and endothelin-1 in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Eur J Pediatr* 2001;160:217-22
34. Eng RH, Hsieh A, Smith SM. Antibiotic killing of bacteria: comparison of bacteria on surfaces and in liquid, growing and nongrowing. *Chemotherapy* 1995;41:113-20
35. Estevez AG, Spear N, Thompson JA, Cornwell TL, Radi R, Barbeito L, Beckman JS. Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 1998;18:3708-14
36. Ferguson DA Jr, Veringa EM, Mayberry WR, Overbeek BP, Lambe DW Jr, Verhoef J. *Bacteroides* and *Staphylococcus* glycocalyx: chemical analysis, and the effects on chemiluminescence and chemotaxis of human polymorphonuclear leucocytes. *Microbios* 1992;69:53-65
37. Finer NN, Barrington KJ. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2001;4:CD000399
38. Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 2001;22:189-216
39. Fortenberry JD, Marolda JR, Anderson DC, Smith CW, Mariscalco MM. CD18-dependent and L-selectin-dependent neutrophil emigration is diminished in neonatal rabbits. *Blood* 1994;84:889-97
40. Fortenberry JD, Bhardwaj V, Niemer P, Cornish JD, Wright JA, Bland L. Neutrophil and cytokine activation with neonatal extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr* 1996;128:670-8
41. Fraticelli A, Serrano CV Jr, Bochner BS, Capogrossi MC, Zweier JL. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochim Biophys Acta* 1996;1310:251-9
42. Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991;83:2038-2047
43. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376
44. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6:S336-S343
45. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989;3:2007-2018
46. Goodrum KJ, McCormick LL, Schneider B. Group B streptococcus-induced nitric oxide production in murine macrophages is CR3 (CD11b/CD18) dependent. *Infect Immun* 1994;62:3102-7
47. Goodrum KJ, Dierksheide J, Yoder BJ. Tumor necrosis factor alpha acts as an autocrine second signal with gamma interferon to induce nitric oxide in group B streptococcus-treated macrophages. *Infect Immun* 1995;63:3715-7
48. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 1998;8:267-71
49. Heneka MT, Dumitrescu L, Loschmann PA, Wullner U, Klockgether T. Temporal, regional, and cell-specific changes of iNOS expression after intrastriatal microinjection of interferon gamma

- and bacterial lipopolysaccharide. *J Chem Neuroanat* 2000; **18**:167-79
50. Heneka MT, Feinstein DL. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol* 2001; **114**:8-18
 51. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; **235** :473-476
 52. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **157**:87-94
 53. Hirsch EC, Hunot S, Damier P, Faucheux B. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann Neurol* 1998; **44**:S115-20
 54. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 1997; **15**:1573-81
 55. Hoehn T, Krause M, Wildberg A, Pringsheim W, Leitis JU. Reversal of a right-left shunt and permanent improvement of oxygenation by inhalation of nitrogen monoxide in a premature infant with lung hypoplasia and asphyxia. *Z Geburtshilfe Neonatol* 1997; **201**:105-7
 56. Hoehn T, Krause M, Hentschel R. High-frequency ventilation augments the effect of inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Eur Respir J* 1998; **11**:234-8
 57. Hoehn T, Huebner J, Paboura E, Krause M, Leitis JU. Effect of therapeutic concentrations of nitric oxide on bacterial growth in vitro. *Crit Care Med* 1998; **26**:1857-62
 58. Hoehn T, Krause MF, Bührer C. Inhaled nitric oxide in premature infants--a meta-analysis. *J Perinat Med* 2000; **28**:7-13
 59. Hoehn T, Felderhoff U, Altstaedt J, Obladen M, Bührer C. Hyperoxia- and hypoxia-mediated activation of polymorphonuclear leukocytes: a comparison of cord and adult venous blood. *Resuscitation* 2001; **51**:63-8
 60. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987; **61**:866-879
 61. Ikeno S, Nagata N, Yoshida S, Takahashi H, Kigawa J, Terakawa N. Immature brain injury via peroxynitrite production induced by inducible nitric oxide synthase after hypoxia-ischemia in rats. *J Obstet Gynaecol Res* 2000; **26**:227-34
 62. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999; **283**:70-4
 63. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; **298**:431-437
 64. Javeshghani D, Magder S. Presence of nitrotyrosine with minimal inducible nitric oxide synthase induction in lipopolysaccharide-treated pigs. *Shock* 2001; **16**:304-11
 65. Kattwinkel J, Niermeyer S, Nadkarni V, Tibballs J, Phillips B, Zideman D, Van Reempts P, Osmond M. Resuscitation of the newly born infant: an advisory statement from the Pediatric Working Group of the International Liaison Committee on Resuscitation. *Resuscitation* 1999; **40**:71-88
 66. Keeney SE, Mathews MJ, Haque AK, Schmalstieg FC. Comparison of pulmonary neutrophils in the adult and neonatal rat after hyperoxia. *Pediatr Res* 1995; **38**:857-63

67. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol* 2001; **1**:1421-41
68. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1997; **272**:31138-48
69. Kinsella JP, Neish SR, Shaffer E, Abman SH. Low-dose inhalational nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; **340**:819-820
70. Kinsella JP, Truog WE, Walsh WF et al. Randomized, multicenter trial of inhaled nitric oxide and high-frequency oscillatory ventilation in severe, persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1997; **131**:55-62
71. Kirsch M, Lehnig M, Korth HG, Sustmann R, de Groot H. Inhibition of peroxynitrite-induced nitration of tyrosine by glutathione in the presence of carbon dioxide through both radical repair and peroxynitrate formation. *Chemistry* 2001; **7**:3313-20
72. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989; **245**:1238-41
73. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; **9**:371-7
74. Koenig JM, Simon J, Anderson DC, Smith E, Smith CW. Diminished soluble and total cellular L-selectin in cord blood is associated with its impaired shedding from activated neutrophils. *Pediatr Res* 1996; **39**:616-21
75. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Urano Y, Higuchi T, Tanaka J, Kudo Y, Nagano T. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. *Neuroreport* 1998; **9**:3345-8
76. Kolker S, Ahlemeyer B, Huhne R, Mayatepek E, Kriegelstein J, Hoffmann GF. Potentiation of 3-hydroxyglutarate neurotoxicity following induction of astrocytic iNOS in neonatal rat hippocampal cultures. *Eur J Neurosci* 2001; **13**:2115-22
77. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; **5**:834-42
78. Kosarikov DN, Lee JM, Uversky VN, Counts Gerber N. Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. *J Inorg Biochem* 2001; **87**:267-76
79. Kotecha S, Silverman M, Shaw RJ, Klein N. Soluble L-selectin concentration in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants who develop chronic lung disease of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; **78**:F143-7
80. Kröncke KD, Fehsel K, Suschek C, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int Immunopharmacol* 2001; **1**:1407-1420
81. Lee C, Miura K, Liu X, Zweier JL. Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000; **275**:38965-72
82. Leist M, Volbracht C, Kuhnle S, Fava E, Ferrando-May E, Nicotera P. Caspase-mediated apoptosis in neuronal excitotoxicity triggered by nitric oxide. *Mol Med* 1997; **3**:750-64
83. Leist M, Fava E, Montecucco C, Nicotera P. Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 1997; **9**:1488-98
84. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate

- (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997;185:1481-6
85. Leviton A, Paneth N, Reuss ML, Susser M, Allred EN, Dammann O, Kuban K, Van Marter LJ, Pagano M, Hegyi T, Hiatt M, Sanocka U, Shahrivar F, Abiri M, Disalvo D, Doubilet P, Kairam R, Kazam E, Kirpekar M, Rosenfeld D, Schonfeld S, Share J, Collins M, Genest D, Shen-Schwarz S. Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. Developmental Epidemiology Network Investigators. *Pediatr Res* 1999;46:566-75
 86. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 2000;28(4 Suppl):N37-52
 87. Liochev SI, Fridovich I. Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the soxRS regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5892-6
 88. Liochev SI, Hausladen A, Beyer WF Jr, Fridovich I. NADPH: ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the soxRS regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1328-31
 89. Mancinelli RL, McKay CP. Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:198-202
 90. Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. 1994;79:1137-46
 91. Martin TR, Ruzinski JT, Wilson CB, Skerrett SJ. Effects of endotoxin in the lungs of neonatal rats: age-dependent impairment of the inflammatory response. *J Infect Dis* 1995;171:134-44
 92. Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 1997;388:432-3
 93. Minc-Golomb D, Yadid G, Tsarfaty I, Resau JH, Schwartz JP. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons. *J Neurochem* 1996;66:1504-9
 94. Mildenerberger E, Siegel G, Versmold HT. Oxygen-dependent regulation of membrane potential and vascular tone of human umbilical vein. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:696-700
 95. Minghetti L, Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* 1998;54:99
 96. Moncada S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992;145:201-27
 97. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12
 98. Murad F, Waldman SA, Fiscus RR, Rapoport RM. Regulation of cyclic GMP synthesis and the interactions with calcium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;8:S57-S60
 99. Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Minc-Golomb D, Schwartz JP. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci* 1993;16:323
 100. Nakayama DK, Geller DA, Lowenstein CJ, Chern HD, Davies P, Pitt BR, Simmons RL, Billiar TR. Cytokines and lipopolysaccharide induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:471-6
 101. Nicotera P, Leist M, Manzo L. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:46-51
 102. Niermeyer S, Kattwinkel J, Van Reempts P, Nadkarni V, Phillips B, Zideman D, Azzopardi D, Berg R, Boyle D, Boyle R, Burchfield D, Carlo W, Chameides L, Denson S, Fallat M, Gerardi M, Gunn A, Hazinski MF, Keenan W, Knaebel S, Milner A, Perlman J, Saugstad OD, Schleien C, Solimano A, Speer M, Toce S, Wiswell T, Zaritsky A. International Guidelines for Neonatal

Resuscitation: An excerpt from the Guidelines 2000 for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care: International Consensus on Science. Contributors and Reviewers for the Neonatal Resuscitation Guidelines. *Pediatrics* 2000; **106**:E29

103. North AJ, Moya FR, Mysore MR, Thomas VL, Wells LB, Wu LC, Shaul PW. Pulmonary endothelial nitric oxide synthase gene expression is decreased in a rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; **13**:676-82
104. Nunoshiba T, DeRojas-Walker T, Tannenbaum SR, Demple B. Nunoshiba T, DeRojas-Walker T, Tannenbaum SR, Demple B. Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages. *Infect Immun* 1995; **63**:794-8
105. O'Donovan DJ, Fernandes CJ. Mitochondrial glutathione and oxidative stress: implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants. *Mol Genet Metab* 2000; **71**:352-8
106. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; **327**:524-526
107. Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **153**:1251-1256
108. Peliowski A, Finer NN, Etches PC, Tierney AJ, Ryan CA. Inhaled nitric oxide for premature infants after prolonged rupture of the membranes. *J Pediatr* 1995; **126**:450-453
109. Pepke-Zaba J, Higenbottam T. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; **338**:1173-1174
110. Pierangeli SS, Sonnenfeld G. Treatment of murine macrophages with murine interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha enhances uptake and intracellular killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Immunol* 1993; **93**:165-71
111. Raghuram N, Fortenberry JD, Owens ML, Brown LA. Effects of exogenous nitric oxide and hyperoxia on lung fibroblast viability and DNA fragmentation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **262**:685-91
112. Rebuck N, Gibson A, Finn A. Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: normal or enhanced leucocyte integrins but defective L-selectin expression and shedding. *Clin Exp Immunol* 1995; **101**:183-9
113. Ridings PC, Windsor AC, Jutila MA, Blocher CR, Fisher BJ, Sholley MM, Sugerman HJ, Fowler AA 3rd. A dual-binding antibody to E- and L-selectin attenuates sepsis-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **152**:247-53
114. Robbins CG, Davis JM, Merritt TA, Amirkhanian JD, Sahgal N, Morin FC III, Horowitz S. Combined effects of nitric oxide and hyperoxia on surfactant function and pulmonary inflammation. *Am J Physiol* 1995; **269**:L545-50
115. Robbins RA, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Adcock IM, Riveros-Moreno V, Moncada S, Polak J, et al. Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **198**:835-43
116. Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WM. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; **340**:818-819
117. Roberts JD Jr, Fineman JR, Morin FC 3rd, Shaul PW, Rimar S, Schreiber MD, Polin RA, Zwass MS, Zayek MM, Gross I, Heymann MA, Zapol WM. Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. The Inhaled Nitric Oxide Study Group. *N Engl J Med* 1997; **336**:605-10
118. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D. Characterization of the importance of

- polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* 1999;67:2627-32
119. Seekamp A, Till GO, Mulligan MS, Paulson JC, Anderson DC, Miyasaka M, Ward PA. Role of selectins in local and remote tissue injury following ischemia and reperfusion. *Am J Pathol* 1994;144:592-8
 120. Sethi S, Sharma P, Dikshit M. Nitric oxide- and oxygen-derived free radical generation from control and lipopolysaccharide-treated rat polymorphonuclear leukocyte. *Nitric Oxide* 2001;5:482-93
 121. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* 1994;94:2231-6
 122. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:13176-81
 123. Sinz EH, Kochanek PM, Dixon CE, Clark RS, Carcillo JA, Schiding JK, Chen M, Wisniewski SR, Carlos TM, Williams D, DeKosky ST, Watkins SC, Marion DW, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. *J Clin Invest* 1999;104:647-56
 124. Smith JB, Tabsh KM. Fetal neutrophils and eosinophils express normal levels of L-selectin. *Pediatr Res* 1993;34:253-7
 125. Sokol J, Jacobs SE, Bohn D. Inhaled nitric oxide for acute hypoxemic respiratory failure in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;4:CD002787
 126. Steudel W, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Weimann J, Huang PL, Jones RC, Picard MH, Zapol WM. Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. *J Clin Invest* 1998;101:2468-77
 127. Stibenz D, Buhner C. Down-regulation of L-selectin surface expression by various leukocyte isolation procedures. *Scand J Immunol* 1994;39:59-63
 128. Stout RD, Li Y, Miller AR, Lambe DW Jr. Staphylococcal glycocalyx activates macrophage prostaglandin E2 and interleukin 1 production and modulates tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production. *Infect Immun* 1994;62:4160-6
 129. Subhedar NV, Ryan SW, Shaw NJ. Open randomised controlled trial of inhaled nitric oxide and early dexamethasone in high risk preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77:F185-90
 130. Taglialatela G, Perez-Polo JR, Rassin DK. Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1998;25:936-42
 131. Tenneti L, D'Emilia DM, Lipton SA. Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neurosci Lett* 1997;236:139-42
 132. The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group. Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. *N Engl J Med* 1997;336:597-604
 133. Török C, Lundahl J, Hed J, Lagercrantz H. Diversity in regulation of adhesion molecules (Mac-1 and L-selectin) in monocytes and neutrophils from neonates and adults. *Arch Dis Child* 1993;68:561-5
 134. Vasileva SV, Stupakova MV, Lobysheva II, Mikoyan VD, Vanin AF. Activation of the

- Escherichia coli* SoxRS-regulon by nitric oxide and its physiological donors. *Biochemistry (Mosc)* 2001;66:984-8
135. Wakita T, Shintani F, Yagi G, Asai M, Nozawa S. Combination of inflammatory cytokines increases nitrite and nitrate levels in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Brain Res* 2001;905:12-20
136. Weinberger B, Weiss K, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD. Pharmacologic therapy of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pharmacol Ther* 2001;89:67-79
137. Weisz A, Cicatiello L. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 1996;316:209-215
138. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998;25:434-56
139. Zhang H, Squadrito GL, Pryor WA. The mechanism of the peroxynitrite-carbon dioxide reaction probed using tyrosine. *Nitric Oxide* 1997;1:301-7

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem langjährigen wissenschaftlichen Kooperationspartner und Freund, Martin Krause. Seine Inspiration, Ideenreichtum und praktische Unterstützung war Grundlage einer höchst konstruktiven Zusammenarbeit.

Mikrobiologische Unterstützung erhielt ich aus wechselnder geographischer Lokation: Johannes Hübner war sowohl in Freiburg als auch in Boston wesentlich an der Umsetzung der Bakterienbegasung beteiligt, hierfür gebührt ihm großer Dank.

Als extrem hilfreich und positiv motivierend hat sich der Gedankenaustausch mit meinem Zimmernachbarn und Freund, Christoph Bühner, erwiesen. An dieser Stelle sei ihm für seine Funktion als ständig sprudelnde Quelle kreativer Ideen und praktischer Vorschläge zu deren Umsetzung herzlich gedankt.

Desweiteren bin ich der gesamten Kooperationsgruppe Neonatologie-Neuropädiatrie zu Dank verpflichtet, die es mir erleichtert hat, inhaltlich die mentale Umstellung von der Lunge auf das Gehirn zu vollziehen. Sowohl die intellektuelle wie auch die manuelle Zusammenarbeit mit Ursula Felderhoff, Petra Bittigau und Chrysanthy Ikonomidou war für die praktische Umsetzung der vorliegenden Ideen unabdingbar.

Weiterer Dank gilt Petra Koehne, Marc Hoppenz und Marco Sifringer für deren Geduld, mich in die Geheimnisse der PCR einzuweisen sowie Christine Stadelmann, die mir bereitwillig die Tricks und Fallen der Immunhistochemie nahezubringen versuchte. Dankbar erinnere ich mich an auch hilfreiche Unterstützung durch Evelyn Strauss sowie die intellektuelle Hilfe im Umgang mit dem Flowzytometer durch Alex Gratopp und Dietger Stibenz.

Möglich wurden die in Berlin entwickelten Forschungsaktivitäten durch die Schaffung der nötigen finanziellen und zeitlichen Rahmenbedingungen; hierfür danke ich meinem Mentor und Chef, Michael Obladen.

Den größten Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit haben meine Frau Birgit und die Kinder, Janina und Marvin. Bei ihnen bedanke ich mich ganz besonders für die langen Stunden, in denen sie auf ihren Partner bzw. Vater verzichten mussten.

Lebenslauf

Name: Dr. med. Thomas Höhn
Geburtsdatum: 3. Januar 1959
Geburtsort: Göggingen
Familienstand: verheiratet mit Birgit Höhn, Hebamme
Kinder: Janina Höhn *1993, Marvin Höhn *1995

Schul Ausbildung

1965-1969 Grundschole München
1969-1978 Neusprachliches Gymnasium Miesbach
6/1978 Abitur

Studium

1980-1981 Studium der Mathematik an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München
1982-1987 Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München
1987/1988 Praktisches Jahr: Innere Medizin Klinikum Großhadern, München; Chirurgie: Health Sciences Center der Universität Manitoba in Winnipeg, Manitoba, Kanada und National Defence Medical Center der Universität Ottawa in Ottawa, Ontario, Kanada; Pädiatrie: Dr. von Haunersche Kinderklinik, Ludwigs-Maximilians-Universität, München

Promotion

1990 "Stressreaktionen von Angstpatienten vor und nach Therapie mit einem 5-Hydroxytryptamin-Antagonisten, einem Betarezeptorenblocker und Placebo" an der Psychiatrischen Klinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München, Berichterstatter Prof. Dr. M. Ackenheil

Berufliche Tätigkeit

2/89 - 7/89 House Officer in Allgemeinchirurgie und Urologie am Queen Elizabeth Hospital in King's Lynn, Norfolk, England
8/89 - 10/89 Senior House Officer in Pädiatrie am Middlesbrough General Hospital in Middlesbrough, Cleveland, England
11/89 - 1/90 Senior House Officer in Neonatologie am South Cleveland Hospital in Middlesbrough, Cleveland, England
2/90 - 7/90 Senior House Officer in Neonatologie am Princess Mary Maternity Hospital und Newcastle General Hospital der Universität Newcastle upon Tyne, England

8/90 - 1/91	Senior House Officer in Pädiatrie und Neonatologie am Shotley Bridge General Hospital, Lehrkrankenhaus der Universität Newcastle, Consett, England
2/91	Senior House Officer in Pädiatrischer Intensivmedizin und Kardiologie am regionalen Herztransplantationszentrum Freeman Hospital der Universität Newcastle upon Tyne, England
3/91 - 2/92	Wissenschaftlicher Assistent in Pädiatrie und Neonatologie an der Kinderklinik der Philipps-Universität Marburg
3/92 - 8/98	Wissenschaftlicher Assistent in Pädiatrie, Neonatologie und Pädiatrischer Intensivmedizin an der Kinderklinik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
seit 9/98	Oberarzt der Klinik für Neonatologie der Charité (Campus Virchow-Klinikum) der Humboldt-Universität zu Berlin

Qualifikationen

September 1995	Facharzt für Kinderheilkunde
März 1996	Schwerpunkt Neonatologie Fakultative Weiterbildung: Spezielle pädiatrische Intensivmedizin

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

.....

Datum

.....

Unterschrift